Escola Politécnica da Universidade de São Paulo
Departamento de Engenharia Química

Meriellen Dias

**COMPARAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE
ESPECTROMETRIA DE MASSAS DOS FUNGOS *Aspergillus niger* E *Rhizopus
microsporus* SUBMETIDOS À ESTRESSE PELA ADIÇÃO DE COBRE**

São Paulo, 2018

Meriellen Dias

**COMPARAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE
ESPECTROMETRIA DE MASSAS DOS FUNGOS *Aspergillus niger* E *Rhizopus
microsporus* SUBMETIDOS À ESTRESSE PELA ADIÇÃO DE COBRE**

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de doutor em Ciências.

Área de Concentração: Engenharia Química

Orientador(a): Dra. Maria Anita Mendes

São Paulo, 2018

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Dias, Meriellen

COMPARAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DOS FUNGOS *Aspergillus niger* E *Rhizopus microsporus* SUBMETIDOS À ESTRESSE PELA ADIÇÃO DE COBRE / M. Dias -- versão corr. -- São Paulo, 2018.

124 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Proteômica 2.Biorremediação 3.Estresse Oxidativo 4.Fungos Filamentosos 5|Espectrometria de Massas I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

**TRABALHO REALIZADO NO LABORATÓRIO DEMPSTER MS LAB DO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA DA ESCOLA POLITÉCNICA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.**

APOIO FINANCEIRO: FAPESP / VALE-BNDES / CAPES / CNPQ

Dedicatória

Dedico essa conquista primeiramente aos meus pais Ademir e Maria Ida pelo apoio, incentivo e amor incondicional, ao meus irmãos Mastrangelo e Maylla por estarem sempre ao meu lado. As minhas avós Auda (*in memoriam*) e Ozília por me ensinarem o verdadeiro significado da palavra família!

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, pela força para vencer cada obstáculo, mesmo enfrentando tantos percalços ao longo do caminho.

Aos meus pais Maria Ida Dipre Dias e Ademir Dipalma Dias pela oportunidade da vida, por todo apoio e amor incondicional, mesmo com toda distância sempre estiveram presente em todos os momentos, apoiando-me em cada tropeço e cada sonho realizado. Amo vocês!

Aos meus irmãos Mastrangelo Dias e Maylla Dias, pela parceria, amor, compreensão em cada etapa da minha vida. Amo vocês!

À minha família tios e primos pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

À minha orientadora, Dr^a. Maria Anita Mendes, pela confiança, incentivo e oportunidades que me proporcionou ao longo da nossa convivência. Agradeço por compartilhar seu conhecimento e me ensinar tanto, e por me apoiar e incentivar a sempre superar meus limites, obrigada pelo apoio incondicional recebido por todos esses anos, seu profissionalismo é um exemplo a ser seguido. Mas OBRIGADA principalmente a esse ser humano ímpar que eu tenho a honra de ter como amiga, serei eternamente grata a Deus por todos os momentos por nós vividos.

Ao Dr. Enrique Eduardo Rozas Sanchez, por todo apoio incondicional, por compartilhar seu conhecimento, por me ensinar tanto, pela parceria de todas as horas e acima de tudo, obrigada por nossa amizade Rocitas!!!

À Dr^a. Lidiane Maria de Andrade, obrigada por seu apoio minha amiga, desde minha chegada a São Paulo há 7 anos atrás, obrigada pelas noites em claro e finais de semana dedicado ao mundo das “omicas”, seu apoio foi fundamental. Obrigada por me ouvir, por me aconselhar, por me acolher com tanto carinho, por compartilhar todos os momentos, isso só fortalece a nossa amizade e cumplicidade.

Ao Prof. Dr. Cláudio Augusto Oller do Nascimento, por me proporcionar toda infraestrutura para o desenvolvimento deste trabalho, pela confiança e por ter me acolhido no laboratório DEMPSTER MS LAB no Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP, obrigada pelos ensinamentos e pela amizade.

À Dr^a. Mariana de Paula Eduardo por compartilhar seu conhecimento e por me ensinar sobre o universo dos fungos, obrigada pelo carinho, parceria, atenção, conversas e amizade.

Ao grande amigo Hugo Hashimoto pela parceria, companhia em todas as horas, por me tirar do mundinho USP e me apresentar esta cidade que eu aprendi a amar, obrigada pelas conversas, risadas (e como damos risadas), por compartilhar seus conhecimentos, obrigada por sua amizade japaaaaa boyyyy!

Ao Dr. Victor Bridi Telles obrigada pela amizade, pelo cuidado e paciência, pelas conversas e companhia no laboratório, sou privilegiada em ter sua amizade.

Ao Jorge Luís Coleti, sem palavras para agradecer todos os momentos que estivemos juntos, pelas conversas, risadas e companhia em todos os momentos desta jornada.

Ao Prof Dr. Jorge Alberto Soares Tenório, obrigada pelo apoio, amizade, e parceria, além de “emprestar” os meninos do Larex (Jorge, Hugo e Victor), sem o auxílio e disposição em nos acompanhar durante as noites de ensaios no laboratório, este trabalho não seria possível. Serei eternamente grata pelo cuidado e pela parceria!

Ao Robson, obrigada pelo amor, carinho, atenção, paciência e compreensão nos últimos meses, sou muito grata a Deus por ter você ao meu lado!

Ao Thalles, obrigada por compartilhar seus conhecimentos e pelo auxílio no tratamento dos dados.

Agradeço aos demais colegas da pós-graduação, obrigada pela convivência e por todos os momentos de aprendizado.

À todos que aqui não nomeei, mas que contribuíram para minha formação e para a realização deste trabalho.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar de novo e fazer um novo fim”.

(Chico Xavier)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2 OBJETIVO.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 METAIS TÓXICOS	4
3.1.1 COBRE.....	5
3.2 MICRORGANISMOS	6
3.3 FUNGOS FILAMENTOSOS	6
3.3.1 GÊNERO <i>ASPERGILLUS</i>	9
3.3.2 GÊNERO <i>RHIZOPUS</i>	10
3.4 PROTEÔMICA	12
3.4.1 DEFINIÇÃO E IMPORTÂNCIA	12
3.4.2 TÉCNICAS PROTEÔMICAS	14
3.4.3 APLICAÇÕES PROTEÔMICAS.....	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS FUNGICAS.	19
4.2 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	19
4.3 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DOS FUNGOS <i>A.NIGER</i> VC E <i>R.MICROSPORUS</i> VC AO COBRE EM FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA E SUBMERSA.	20
4.3.1 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DOS FUNGOS <i>A.NIGER</i> VC E <i>R.MICROSPORUS</i> VC AO COBRE EM FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA	20
4.3.2 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DOS FUNGOS <i>A.NIGER</i> VC E <i>R.MICROSPORUS</i> VC AO COBRE EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA	20
4.5 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E PREPARAÇÃO DO EXTRATO PROTEICO DOS FUNGOS <i>A.NIGER</i> VC E <i>R.MICROSPORUS</i> VC EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA.	22
4.6 DIGESTÃO DO EXTRATO PROTÊICO PARA ANÁLISE POR NANO LC-ESI-Q-TOF	22
4.7 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PELA TÉCNICA NANO LC-ESI-Q-TOF	23
4.9 DESENHO EXPERIMENTAL DA ANÁLISE PROTEÔMICA.	25
5 RESULTADOS	26
5.1- AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DOS FUNGOS <i>A.NIGER</i> VC E <i>R.MICROSPORUS</i> VC AO COBRE EM MEIO, SEMI-SÓLIDA E SUBMERSA.	26
5.1.1 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DO <i>A.NIGER</i> VC E <i>R.MICROSPORUS</i> VC AO COBRE EM FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA (TOXICIDADE EM PLACAS)	27

5.1.2 CURVA DE CRESCIMENTO E QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR - FERMENTAÇÃO SUBMERSA	29
5.2 ENSAIOS DE ADSORÇÃO EM BATELADA PARA REMOÇÃO Cu^{2+}	31
5.3 ANÁLISES PROTEÔMICAS DAS ESPÉCIES	32
5.3.1- ASPERGILLUS NIGER VC	33
5.3.2- RHIZOPUS MICROSPORUS VC	45
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÕES.....	69
8 PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS.	71
9 PUBLICAÇÕES EM REVISTA CIENTÍFICA	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXO I	82
ANEXO II.....	100

RESUMO

O aumento da complexidade dos resíduos produzidos nos processos de mineração, que acompanha a crescente expansão deste setor no Brasil, tem revelado a necessidade de novas técnicas para o tratamento ecologicamente correto dos rejeitos de mineração. Desta forma, a biorremediação, uma técnica de baixo custo que utiliza microrganismos extremófilos na recuperação de metais tóxicos, se apresenta como um método economicamente viável no tratamento dos rejeitos contendo íons metálicos. Assim, mediante uma análise proteômica dos fungos isolados do ambiente de mineração, quando submetidos a estresse com íons de cobre, podemos compreender seu comportamento fisiológico no processo de biorremediação. Para isso, *Aspergillus niger* VC e *Rhizopus microsporus* VC, isolados do ambiente de mineração foram incubados junto a íons de cobre e mediante análise proteômica foram identificados biomarcadores de estresse oxidativo nos fungos. O proteoma realizado utilizando a técnica de NanoLC-ESI-Q-TOF identificou a expressão de proteínas que mudaram sob a influência do cobre em comparação a seus respectivos controles. Os resultados mostraram que as duas cepas obtidas do ambiente de mineração possuem diferentes mecanismos de resistência. Sendo assim, *A.niger* VC apresentou uma redução na expressão proteica, das quais 132 foram diferencialmente expressas na presença de íons Cu^{2+} . Por sua vez, a cepa *R.microsporus* VC exibiu uma superexpressão proteica, com 389 proteínas expressas na presença do metal. Nestes cultivos foram identificadas proteínas relacionadas ao choque térmico e à adsorção de metais, conhecidas como proteínas de choque térmico (HSPs) e metaloproteínas, produzidas em resposta ao estresse imposto pela presença do agente indutor de estresse. No entanto, as enzimas envolvidas na defesa contra o estresse oxidativo, identificadas na ausência de metal, são um indicativo de adaptação metabólica em resposta ao ambiente de mineração. Assim concluímos que tanto *A.niger* VC como *R.microsporus* VC, são fungos que apresentam importantes características que permitem sua utilização como agentes de biorremediação dos rejeitos de mineração.

Palavras-chave: Proteômica, Biorremediação, Estresse Oxidativo, Fungos Filamentosos, Espectrometria de Massas.

ABSTRACT

The increase in the complexity of the waste produced in the mining process, with the growing expansion of this sector in Brazil, has revealed the need for new techniques for the ecologically correct treatment of this toxic waste. Therefore, bioremediation, a low cost technique that uses endophilic microorganisms in the recovery of toxic metals, presented as an economically viable method in the treatment of metal ion-containing wastes. In this way, through proteomic analysis of the isolated fungus from the mining environment, when submitted to stress with copper ions, we can understand their physiological behavior in the bioremediation process. In this regard, *Aspergillus niger* VC and *Rhizopus microsporus* VC, isolated from the mining environment were incubated with copper ions and in result of proteomic analysis, biomarkers of oxidative stress were identified in the fungus. The proteome performed using the NanoLC-ESI-Q-TOF technique identified the expression of proteins that changed under the copper influence compared to their respective controls. The results showed that the two strains obtained from the mining environment have different resistance mechanisms. Thus, *A.niger* VC presented a reduction in protein expression, of which 132 were differentially expressed in the presence of Cu^{2+} ions. In turn, the strain *R.microsporus* VC exhibited a protein overexpression, with 389 proteins expressed in the metal presence. In these cultivations, proteins related to thermal shock and the adsorption of metals, known as HSPs and metalloproteins, produced in response to the stress imposed by the presence of the stress-inducing agent. However, the enzymes involved in defense against oxidative stress, identified in absence of metal, are indicative of metabolic adaptation in response to the mining environment. Therefore we conclude that both *A.niger* VC and *R.microsporus* VC are fungus that present important characteristics that allow their to be used as bioremediation agents for mining waste.

Keywords: Proteomic, bioremediation, oxidative stress, filamentous fungus, Mass Spectrometry

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviação	Significado
ACN	Acetonitrila
AF	Ácido fórmico
Co	Cobalto
CONAMA	Conselho nacional do meio ambiente
Cu	Cobre
DNPM	Departamento nacional de produção mineral
EPA	Agência de proteção ambiental- Norte americana
ESI	Ionização por eletrospray
FDR	Taxa de falsa descoberta
FGH	<i>S-formylglutathione hydrolase</i>
GO	Ontologia genética
GSH	Glutathione
HSP	Proteína de choque térmico
m/z	Razão massa/carga
MIC	Mínima concentração inibitória
Mo	Molibidênio
nano LC	Nano cromatografia líquida
PD	Potato dextrose (amido de batata)
PDA	Potato dextrose ágar
pI	Ponto isoelétrico
Q-TOF	Quadrupolo –Tempo de voo
TFA	Ácido trifluoroacético
Zn	Zinco
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dez principais proteínas identificadas com maior número de peptídeos em condições diferentes de cultivo do fungo <i>A.niger</i> VC.....	35
Tabela 2: Identificação de HSPs diferencialmente expressas em <i>A.niger</i> VC após incubação em presença e ausência de íons Cu^{2+}	39
Tabela 3: Proteínas diferencialmente identificadas por espectrometria de massas do fungo <i>A.niger</i> VC em presença de íons Cu^{2+} (Uniprot, http://www.uniprot.org).....	40
Tabela 4: Metaloproteínas diferencialmente expressas <i>A.niger</i> VC em presença e ausência de íons Cu^{2+}	44
Tabela 5: Dez principais proteínas identificadas com maior número de peptídeos em condições diferentes de cultivo do fungo <i>R.microsporus</i> VC.....	46
Tabela 6: Identificação de HSPs diferencialmente expressas em <i>R.microsporus</i> VC após incubação em presença e ausência de íons Cu^{2+}	48
Tabela 7: Proteínas identificadas por espectrometria de massas do fungo <i>R.microsporus</i> VC em presença de íons Cu^{2+} (Uniprot, http://www.uniprot.org).....	52
Tabela 8: Metaloproteínas diferencialmente expressas <i>R.microsporus</i> VC na presença e ausência de íons Cu^{2+}	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aplicações de fungos filamentosos em diferentes setores industriais e de pesquisa (PUTZKE e PUTZKE, 2002, CHAMBERGO e VALENCIA, 2016).....	8
Figura 2: Imagens adquiridas em estereomicroscópio da espécie <i>A.niger</i> VC (ScopeA1, Carl Zeiss-320 X).....	10
Figura 3: Imagens adquiridas da espécie <i>R.microsporus</i> VC em estereomicroscópio (ScopeA1, Carl Zeiss- 320X).....	12
Figura 4: Fonte de ionização MALDI – Ionização da mistura amostra/matriz BRUKER, 2013a).....	15
Figura 5: Fonte de ionização ESI- Ionização de amostra líquida submetida a uma diferença de potencial elétrico.....	16
Figura 6: Mapa de localização da lagoa de rejeito - Mina de Sossego - Canaã dos Carajas-PA.....	19
Figura 7: Fluxograma das etapas de análise proteômica dos fungos <i>A.niger</i> VC e <i>R.microsporus</i> VC.....	25
Figura 8: Placas inoculadas com esporos de <i>A.niger</i> VC em meio de cultivo PDA após 15 dias: (A) Sem cobre. (B) 50 mg/L de cobre. (C) 100 mg/L de cobre. (D) 200 mg/L de cobre. (E) 400 mg/L de cobre.....	28
Figura 9: Placas inoculadas com esporos de <i>R.microsporus</i> VC no meio de cultivo PDA após 15 dias: (A) Sem cobre. (B) 50 mg/L de cobre. (C) 100 mg/L de cobre. (D) 200 mg/L de cobre.....	28
Figura 10: Curva de crescimento celular do fungo <i>A.niger</i> VC (●) ausência de cobre, (■) 50mg/L de Cu ²⁺	30
Figura 11: Curva de crescimento celular do fungo <i>R.microsporus</i> VC (●) ausência de cobre, (■) 50mg/L de Cu ²⁺	30
Figura 12: Adsorção de íons Cu ²⁺ no cultivo dos fungos <i>A.niger</i> VC e <i>R.microsporus</i> VC em 50 mg/L.....	32
Figura 13: Diagrama de Venn do perfil proteômico da espécie <i>A.niger</i> VC: 72 horas de incubação em meio PD: (A) ausência de cobre; (B) presença de cobre.....	33

Figura 14: Função Molecular no fungo <i>A.niger</i> VC na ausência de cobre (Uniprot, http://www.uniprot.org).....	37
Figura 15: Função Molecular no fungo <i>A.niger</i> VC em presença de cobre (50 mg/L Cu ²⁺) (Uniprot, http://www.uniprot.org).....	37
Figura 16: Processos Biológicos expressos no fungo <i>A.niger</i> VC: (■) ausência de cobre e (■) presença de Cu ²⁺ (Uniprot, http://www.uniprot.org).....	42
Figura 17: Diagrama de Venn da análise proteômica da espécie <i>R.microsporus</i> VC com 48 horas de incubação em meio PD: (A) ausência de cobre; (B) presença de cobre.....	45
Figura 18: Função Molecular do fungo <i>R.microsporus</i> VC na ausência de cobre (Uniprot, http://www.uniprot.org).....	50
Figura 19: Função Molecular do fungo <i>R.microsporus</i> VC em presença de cobre (50mg/L Cu ²⁺) (Uniprot, http://www.uniprot.org).....	50
Figura 20: Processos Biológicos expressos no fungo <i>R.microsporus</i> VC: (■) ausência de cobre e (■) presença de Cu ²⁺ (Uniprot, http://www.uniprot.org).....	54

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O aumento na produção de cobre no Brasil tem incentivado a exploração de novas jazidas de minério, destacando-se a Empresa Vale S.A., principal produtora de concentrado de cobre no estado do Pará. A produção de concentrado de cobre foi ampliada em 90% entre os anos 1998 e 2015, para a produção de cobre primário e secundário. Estima-se que em 2030 a produção nacional do metal atinja 374.000 t/ano, uma vez que as reservas brasileiras estão avaliadas em 21 milhões de toneladas (Departamento Nacional de Produção Mineral, 2017).

A crescente expansão dos processos de mineração no Brasil vem aumentando quantitativamente a complexidade dos resíduos tóxicos lançados ao meio ambiente. Metais como o cobre e o cromo, apesar de terem um importante papel nas reações bioquímicas da biota, são tóxicos em altas concentrações. A toxicidade desses metais está relacionada à concentração do íon, que, quando superior à capacidade de resistência do organismo, provoca danos fisiológicos devido à interferências nos processos biológicos, como ativação enzimática, transcrição e tradução de DNA ou na integridade celular (VULLO, 2003; GADD 2014).

A busca por processos que minimizem os danos ambientais causados pela presença de metais tóxicos tem se intensificado nos últimos anos. Alguns estudos têm demonstrado o potencial dos microrganismos tais como algas, bactérias e fungos em processos de biorremediação por eles se adaptarem às altas concentrações de metais tóxicos e por ser um processo economicamente viável e ecologicamente correto, quando comparado às atuais tecnologias de tratamento de efluente como precipitação, troca-iônica osmose reversa ou evaporação (GADD, 2014).

Assim, o estudo do estresse oxidativo dos microrganismos vem despertando grande interesse, devido à relação existente entre as respostas fisiológicas e os danos sofridos pelo metabolismo celular. Os microrganismos respondem de maneiras diferentes quando submetidos a presença de poluentes, emitindo respostas que vão da super expressão ou subexpressão de compostos orgânicos (principalmente proteínas). Estes compostos são usados como biomarcadores convencionais, embora seu uso exija um profundo conhecimento dos mecanismos tóxicos, e esses biomarcadores são apenas parcialmente conhecidos, pois se concentram em proteínas já caracterizadas, mas excluem outras que também podem ser alteradas (IRAZUSTA et al., 2012).

A proteômica é uma importante abordagem na descoberta de novos biomarcadores, os quais são complementos protéicos ou componentes celulares que reagem especificamente a um poluente, indicando quando o poluente está causando dano ambiental (LÓPEZ e GÓMEZ, 2006). Portanto, as abordagens proteômicas fornecem ferramentas para estudar variações significativas na expressão das proteínas entre diferentes ambientes (e.g. poluído e não poluído) possibilitando sua utilização como biomarcadores (IRAZUSTA et al., 2012). No entanto, o uso destas abordagens proteômicas nos estudos ambientais não está livre de limitações, contudo mudanças na expressão protéica são essenciais quando examinarmos o comportamento celular.

Neste contexto, amostras de solo e água foram coletadas em diferentes pontos da lagoa de rejeito da Mina de Sossego (Canaã dos Carajás- Pará), dessas coletas foram isoladas 23 espécies de fungos, sendo realizados testes prévios de adsorção de íons Cu^{2+} em cada espécie, sendo observado maior potencial de adsorção de íons metálicos nos fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus microsporus*. Portanto, a caracterização de proteínas através da análise proteômica dos fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus microsporus* proveniente de mina de cobre (Vale) foi utilizada como ferramenta para elucidar a resposta metabólica dos fungos após a exposição ao cobre.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar o perfil proteômico dos fungos *Aspergillus niger* VC e *Rhizopus microsporus* VC, provenientes da mina de cobre “Sossego” da Empresa Vale S.A (Canaã dos Carajas- Para- Brasil), expostos ao cobre como agente indutor do estresse oxidativo.

Para atingir esse objetivo as seguintes etapas foram realizadas:

- ✓ Estudar a curva de crescimento dos fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC na presença e na ausência de cobre
- ✓ Avaliar o potencial de adsorção de cobre pelos fungos;
- ✓ Identificar e caracterizar o perfil proteômico, em condições de estresse oxidativo dos microrganismos nas diferentes condições de cultivo;
- ✓ Identificar proteínas expressas, superexpressas e subexpressas nos fungos;
- ✓ Identificar proteínas envolvidas na tolerância ao cobre pelos fungos;
- ✓ Identificar e propor quais vias metabólicas estão sendo induzidas durante o estresse oxidativo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Metais Tóxicos

Considerando o metabolismo celular, metais como zinco (Zn), cobre (Cu), cobalto (Co) e molibdênio (Mo), são usualmente encontrados nos grupos prostéticos das enzimas de vias metabólicas essenciais. Entretanto, esses metais abundantemente presentes na natureza, em concentrações elevadas, podem ser tóxicos.

Consequentemente, os rejeitos produzidos pela exploração de minérios que contêm altas concentrações de metais, significam um risco ambiental. Alterações na microbiota do solo e da água, induzindo à seleção de microrganismos que desenvolveram resistência a esses metais, reduzindo o número de espécies microbianas na microbiota local (KAVAMURA e ESPOSITO, 2010).

Em ecossistemas expostos à contaminantes (e.g metais tóxicos), plantas e animais podem absorvê-los e acumulá-los, sendo este processo denominado bioacumulação. Essa bioacumulação, potencializada na cadeia alimentar, resulta em mortalidade ou problemas reprodutivos nos animais do topo da cadeia (CALLENDER, 2007; JIMENEZ et al., 2004; KORF et al., 2008; SIMEONOV et al., 2011).

Estudos realizados pelas agências americanas ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) e EPA (*Environmental Protection Agency*) constataram que a exposição a metais como cobre, cromo, zinco e níquel por períodos prolongados são prejudiciais à saúde humana, resultando em sutis mudanças psicológicas. No entanto, a origem dessa exposição é geralmente ignorada (ATSDR, 2004; GADD, 2004; SIMEONOV et al., 2011).

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece resoluções para despejo de efluentes contendo metais. A Resolução nº 430, de 13 de Maio de 2011 complementar a Resolução nº 357, de 17 de Março de 2005, estabelece como limite máximo para emissão de cobre em efluentes o valor de 1,0 mg/L, sendo despejado direta ou indiretamente, nos corpos de água. Portanto, o controle das emissões dos metais tóxicos, como cobre por exemplo, deve ser realizado diretamente na fonte poluidora, antes de serem encaminhados ao ecossistema.

3.1.1 Cobre

O cobre está presente na natureza em quatro estados de oxidação: metálico (Cu^0), íon cuproso (Cu^{+1}), íon cúprico (Cu^{2+}) e íon trivalente (Cu^{3+}).

Nos microrganismos, os íons de cobre metálico são essenciais para eucariotos e bactérias, sendo utilizados estruturalmente em processos bioquímicos e como cofatores catalíticos essenciais para a vida. Entretanto, excesso de íons cobre na célula gera espécies reativas, a partir de sua reação com o oxigênio, ocasionando danos aos ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (LALLIOTI et al., 2009; BANCI et al., 2011).

Nos seres humanos o cobre desempenha um papel importante no metabolismo, pois atua como cofator de uma série de metaloenzimas envolvidas na formação de hemoglobina sendo que um homem adulto necessita diariamente de 2 mg de cobre, e que o mesmo esteja presente no corpo humano em uma concentração de 150 mg. A deficiência deste metal na dieta pode causar anemia, diarreia e distúrbios nervosos. Por outro lado, o sulfato de cobre quando ingerido de forma excessiva pode causar vômitos, diarreia, câimbras, convulsões e até mesmo a morte (ATSDR, 2004; COBRE-NAUTILUS, 2016).

A produção brasileira de cobre se distribui pelos estados do Pará (68%), Goiás (23,7%) e Bahia (8,3%), de acordo com o Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM/Sumário Mineral, 2014).

O cobre metálico é muito utilizado por apresentar alta durabilidade, boa resistência à corrosão, boa maleabilidade e ductibilidade, podendo ser transformados em lâminas, fios, bastões e tubulações, além da cunhagem de moedas e peças decorativas. Também é utilizado como fungicida, anti-incrustante em pintura de cascos de navios, inseticida, além aditivo agrícola para solos, evitando que qualquer deficiência de cobre afete as colheitas (ATSDR, 2004; FARIAS, 2014). Entretanto, produtos e resíduos de metais tóxicos, presentes em inúmeras atividades agrícolas, urbanas e industriais, são potenciais contaminantes de mananciais e solo.

Por isso, a busca por processos que minimizem os danos ambientais causados pela presença desses metais tóxicos tem se intensificado nos últimos anos, e um dos processos mais atrativos é a biorremediação, ou seja, o processo pelo qual microrganismos são aplicados visando reduzir ou remover as contaminações no ambiente.

3.2 Microrganismos

As bactérias, fungos e leveduras podem crescer em diversos substratos (sólido, líquido), oferecendo diferentes aplicações biotecnológicas de interesse industrial dependendo das técnicas de cultivo utilizadas como por exemplo, fermentação em estado sólido (SOCCOL, 1994). Os fungos filamentosos são muito comuns no processo de fermentação em estado sólido, pois o processo reproduz algumas condições de seu *habitat* natural.

Os ecossistemas das áreas de mineração são habitados por diferentes grupos de microrganismos tais como algas, fungos, leveduras e bactérias, cuja diversidade é influenciada pelos metais presentes no ecossistema (WHITMAN et al., 1998; TORTORA et al., 2008). As células destes organismos possuem a capacidade para acumular metais na membrana celular (bioacumulação), efeito diretamente dependente do metabolismo de cada linhagem microbiana (GADD, 2001).

Atualmente esses microrganismos têm sido muito utilizados em processos de biorremediação, visando explorar a diversidade genética e a versatilidade metabólica microbiana, para a transformação de contaminantes em produtos menos tóxicos que podem ser integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais (UETA et.al., 1999). Dentre eles, a utilização de enzimas fúngicas também vêm sendo exploradas quanto à sua aplicabilidade na recuperação de ambientes degradados por poluentes químicos e pela indústria mineradora (CHAMBERGO e VALENCIA, 2016). Por este motivo, os fungos filamentosos têm sido estudados nos últimos anos visando os processos de biorremediação.

3.3 Fungos Filamentosos

Os fungos são organismos eucariontes, unicelulares (leveduras) ou multicelulares (fungos filamentosos), haplóides (homo ou heterocarióticos), com parede celular contendo quitina e α -glucanos (TORTORA et.al., 2008). A estrutura de um fungo filamentoso consiste em um micélio – (constituído por hifas com 5 a 10 μ m de largura) e esporos latentes. Os micélios formados ao longo do crescimento do fungo envolvem o substrato, de onde são absorvidos os nutrientes orgânicos necessários para continuar crescendo e/ou sobrevivendo (PELCZAR et.al., 1996; TORTORA et.al., 2008).

Os fungos apresentam atividades biológicas únicas, que os tornam indispensáveis ao meio ambiente, participam da decomposição de matéria orgânica, desempenham papéis ecológicos críticos no ciclo global do carbono e na reciclagem de nutrientes. São essenciais a sobrevivência de muitos organismos com os quais estabelecem associações como mutualismo, destacam-se na absorção e mineralização de íons metálicos, além de apresentarem grande potencial em processos biotecnológicos como por exemplo biocombustíveis e também na produção biológica como enzimas degradantes de biomassa (BAKER et al., 2008, CHAMBERGO e VALENCIA, 2016).

Atualmente tem sido descobertas de novas aplicações para a biomassa de fungos, pois apresentam grande potencial para seu uso industrial como por exemplo, na fabricação de produtos farmacêuticos, bioissorventes, biocatalisadores para reações quirais, suplementos nutricionais, cosméticos, agroquímicos, biomateriais e enzimas, onde cada um desses bioprodutos tem um valor de mercado potencialmente alto (CHAMBERGO e VALENCIA, 2016). A Figura 1 apresenta algumas das principais aplicações dos fungos em diferentes setores.

Figura 1: Aplicações de fungos filamentosos em diferentes setores industriais e de pesquisa.(PUTZKE e PUTZKE, 2002, CHAMBERGO e VALENCIA, 2016).

O estudo dos fungos filamentosos vem aumentando a cada ano, pois são amplamente distribuídos em todos os habitats e ecossistemas terrestres, conhecidos por produzir grande variedade de proteínas heterólogas, uma grande variedade de ácidos orgânicos e outros metabólitos, além de enzimas como proteases, amilases, celulases, lipases, lactases. Apresentam ainda capacidade de remoção de compostos orgânicos e inorgânicos presentes no meio ambiente. São extremamente resistentes à variações de temperatura e pH, sobrevivem em condições adversas e seu metabolismo secundário encontra-se associado aos processos de esporulação sexuada e assexuada (TORTORA et al., 2008; CHAMBERGO e VALENCIA, 2016). Dentre os fungos filamentosos podemos destacar os gêneros *Aspergillus sp.* e *Rhizopus sp.* por apresentarem grande potencial em processos de biorremediação.

3.3.1 Gênero *Aspergillus*

Os fungos do gênero *Aspergillus* são classificados dentro do Reino Fungi como pertencentes ao Filo: Ascomycota, Classe: Eurotiomycetes, Ordem: Eurotiales, Família: Trichocomaceae, Gênero: *Aspergillus*, sendo as principais espécies: *A.flavus*, *A.fumigatus*, *A.nidulus*, *A.niger*, *A.oryzae*, *A.candidus*, *A.ochraceus* e *A.deflectus*.

O gênero *Aspergillus* possui características anamorfas (fase assexuada ou mitótica) e podem ser uni- ou pluricelulares, sendo a última forma a mais abundante na natureza (KLICH, 2002; CAROLIS, 2012). São economicamente importantes devido ao grande potencial de geração de diversos produtos, destacando a produção de ácido cítrico.

O fungo *Aspergillus* sp. possui habilidade de degradar biomassa vegetal bem como se adaptar metabolicamente à diferentes fontes de carbono e nitrogênio, permitindo ocupar uma série de nichos ecológicos como solos, madeira e outros resíduos orgânicos (BOUWS et al., 2008). O fungo filamentosso *Aspergillus* sp. se destaca pelo potencial biotecnológico, sendo amplamente utilizado na indústria na produção de enzimas e ácidos orgânicos tais como ácido cítrico e ácido gálico. Este fungo apresenta grande capacidade de bioabsorção de metais tóxicos, capacidade de produção de enzimas e ácidos orgânicos, podendo aumentar os rendimentos e reduzir o custo do descarte dos resíduos de biomassa provenientes de processos industriais (WAIHUNG et al., 1999; KAPOOR et al., 1999)

Na década de sessenta, Sternberg (STERNBERG et al. 1977) descreveram o *A.niger* como uma importante fonte de produção de enzimas, mediante a fermentação industrial do fungo; destacando a produção da enzima glucoamilase, muito utilizada na fabricação de xarope com alto teor de frutose e também a pectinase utilizada para clarificar a sidra e o vinho. Kapoor, (KAPOOR et al., 1999) identificou a capacidade do fungo *A.niger* para remover metais tóxicos como cobre, zinco e níquel (10 mg/L) de águas residuais de indústrias químicas. Liu (LIU et al., 2006), em estudos de bioabsorção, descreveu a eficiência do fungo *A.niger* na remoção de cádmio (Cd^{+2}) e zinco (Zn^{+2}) por meio de atividades metabólicas. Pel (PEL et al., 2007) sequenciou o genoma da espécie *A.niger* codificando 14.165 genes. A espécie *A.niger* VC coletada em ambiente de mina, e estudado neste estudo está representada na Figura 2.

Figura 2: Imagens adquiridas em estereomicroscópio da espécie *A.niger* VC (ScopeA1, Carl Zeiss-320 X).

Long,(LONG et al.,2017) estudou a absorção de cobre (II) utilizando micélios e esclerócios do fungo *A.oryzae* G15, descrevendo os esclerócios (73,53 mg/g) como as estruturas com maior capacidade de biosorção que os micélios (35,34 mg/g), e atribuindo essa absorção à maior quantidade de sítios carboxílicos expostos após a diferenciação celular. Além da capacidade de regeneração e reutilização dos biossorbentes carregados de Cu(II), indicando que *A.oryzae* G15 poderia ser considerado como uma alternativa viável para a remoção de Cu(II) nas águas residuais.

3.3.2 Gênero *Rhizopus*

Os fungos do gênero *Rhizopus* são classificados no Reino Fungi como pertencentes ao Filo: Zygomycota, Classe: Zygomycetes, Ordem: Mucolares, Família: Mucolaceae, Gênero: *Rhizopus*, sendo as espécies mais comuns *R.oligosporus*, *R.arrhizua*, *R.circicans*, *R.delemar*, *R.oryzea*, *R.microsporus*, *R.formosa* e *R.stolonifer*. Estes fungos são formados por inúmeros filamentos denominados hifas, que se entrelaçam dando origem ao micélio, podendo ser encontrados no solo, frutas e vegetais em decomposição, fezes de animais e também no pão (SPIER, 2005). Classificado como termotolerante, uma das principais vantagens de se utilizar este fungo é sua fácil manipulação, pois é capaz de crescer em diferentes substratos e produzir grande variedade de bioprodutos (KITPREECHAVANICH et al., 2008).

R.oryzae é amplamente utilizado em países asiáticos em processos fermentativos em escala industrial, como por exemplo, na produção de glucoamilases (MERTENS e SKORY, 2007; KITPREECHAVANICH et al., 2008). O fungo *R.microsporus* é comumente encontrado no solo, resíduos vegetais e alimentícios. É um patógeno encontrado em diversos ambientes principalmente em solos com pH neutro (SPIER, 2005).

A capacidade do fungo *R.arrhizus* para biosorver o cianato de ferro (III) presente em águas residuais, reduzindo significativamente sua concentração em condição altamente alcalina (pH 13) e também que o fungo *R.arrhizus* é uma alternativa eficaz na remoção de outras espécies de metais tóxicos presentes nos efluentes, foi descrito por Aksu (AKSU et al., 1999)

Estudos demonstraram que os esporos do fungo *R.oryzae* imobilizados em criogel de poli álcool vinílico macroporoso (PVA-criogel) podem ser usados como biocatalisante, capazes de produzir L(+) ácido láctico (LA). As células de fungos presas em PVA-criogel apresentam maior resitência e maior rendimento de LA no ciclo de trabalho iterativo do que nas células livres, sendo uma alternativa mais atraente para aplicações biotecnológicas. (EFREMENKO et al., 2006)

Em 2017, Kodál e Aksu descreveram a biossorção de corantes pelo fungo *R.arrhizus* em presença do agente tensioativo catiônico brometo de cetil trimetilamônio (CTAB). Neste estudo foi observado que após a adição de CTAB houve alteração do pH, indicando maior absorção de corante pela biomassa fúngica em presença do agente tensoativo (KODAL e AKSU, 2017). A espécie *R.microsporus* VC coletada em ambiente de mina, e estudada neste estudo está representada na Figura 3.

Figura 3: Imagens adquiridas da espécie *R.microsporus* VC em estereomicroscópio (ScopeA1, Carl Zeiss- 320X).

Devido à importância dos fungos em processos de bioremediação, o estudo proteômico se destaca como uma técnica eficaz na identificação de biomarcadores ambientais e no estudo do metabolismo do fungo em condições de estresse oxidativo.

3.4 Proteômica

3.4.1 Definição e Importância

A dinâmica celular depende do fluxo de informações entre os diferentes processos fisiológicos, ou seja, informações do DNA são transcritas em RNAm que são traduzidas em proteínas ou metabólitos que interagem com outras moléculas que participam das redes regulatórias. No entanto, a quantidade de sequências de DNA no banco de dados não é suficiente para identificar todas as funções biológicas, o que reforça a necessidade do estudo do RNAm, proteínas e metabólitos, gerando os novos campos de pesquisa denominados “ômicas”: genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica, entre outras (ZHANG et.al., 2010).

O termo proteoma foi usado pela primeira vez por Marc Wilkins, em meados dos anos 90, para descrever o conjunto completo de proteínas que são expressas e modificadas a partir do genoma (WILKINS et al., 1996; ZHAO et al., 2003). Atualmente a proteômica tem sido definida como uma técnica complementar, capaz de mostrar mediante uma visão abrangente o perfil protéico de um organismo, célula ou tecido em uma condição específica.

A análise proteômica tem como objetivo obter e identificar todas as proteínas presentes nas células, integrando-as uma visão fisiológica, para criar um mapa tridimensional da célula, facilitando a localização destas proteínas no ambiente celular. Esta é uma análise essencialmente diferente do estudo do genoma, que funciona como um repositório estático das informações genéticas (GRAVES e HAYSTEAD, 2002).

Esta análise permite a caracterização de todas as proteínas (ou maior parte delas) presentes em diferentes tipos de amostras como célula, tecido, organismo ou fluidos gerados em diferentes estados fisiológicos (DI CIERO e BELLATO, 2003). Assim, permite uma comparação qualitativa e quantitativa do conjunto de proteínas expressas nas diferentes etapas da divisão celular, nas quais os diferentes estados metabólicos são dependentes do estágio de desenvolvimento celular e do ecossistema em que os organismos vivem (WITTMANN-LIEBOLD et al., 2006; BARROS et al., 2010).

A proteômica surge também como uma ferramenta muito versátil na busca de novas informações, mediante as quais é possível caracterizar ou identificar alterações produzidas por diferentes estímulos ambientais, que podem ser moduladas por modificações pós-traducionais. Consequentemente, a identificação das proteínas expressas pelos microrganismos quando submetidos a algum tipo de estresse determina um perfil protéico característico para aquelas células sob condições específicas (HECKER et al., 2010; WILHELM et al., 2014).

O interesse na área proteômica vem aumentando, devido principalmente à integração e automatização de uma variedade de técnicas e equipamentos que permitem separar, identificar, quantificar, caracterizar e observar mudanças pós-traducionais, processamento, danos e degradação de proteínas de interesse (HECKER et al., 2010).

Os estudos proteômicos têm gerado informações que permitem alcançar diferentes objetivos como: a) identificar as proteínas envolvidas nas rotas metabólicas relacionadas aos diferentes processos celulares; b) identificar novos marcadores biológicos relacionados ao estresse oxidativo; c) compreender melhor as proteínas de adsorção de metais e a utilização das mesmas na descontaminação do meio ambiente (BARROS et al., 2010; WILHELM et al., 2014).

Entretanto, a análise proteômica total ainda é desafiadora devido à sua alta complexidade, pois um gene particular pode gerar múltiplas proteínas distintas, apresentando

propriedades físico-químicas variadas e diferentes intervalos de interação proteína-proteína, exigindo o desenvolvimento de técnicas analíticas cada vez mais robustas (DOMON; AEBERSOLD, 2006; HECKER et al., 2010; WILHELM et al., 2014).

3.4.2 Técnicas Proteômicas

A proteômica envolve as etapas de isolamento das proteínas a partir de uma fonte biológica, este isolamento é realizado através de técnicas unidimensionais como cromatografia líquida ou gel (LC ou 1D, respectivamente) ou bidimensionais como LC/LC ou eletroforese 2D-PAGE. A eletroforese 2D-PAGE envolve o extrato celular (mistura complexa de proteínas) disperso em um gel de poliacrilamida que permite a separação das proteínas através do ponto isoelétrico (pI) e da massa molecular (MM) (GÖRG et al., 2004). A eletroforese 2D-PAGE tem resolução suficiente para separar diferentes estados de uma proteína e identificar a proporção relativa entre elas, acrescentando dados significativos no estudo da fisiologia de determinado organismo ou de uma via metabólica (MANN e JENSEN, 2003). A cromatografia líquida, por sua vez, utiliza o extrato celular digerido, permitindo a detecção de proteínas menos abundantes, pouco solúveis ou com mesmos pontos isoelétricos, além de possibilitar o acoplamento a um espectrômetro de massas (HAN et al, 2010).

A identificação e caracterização das proteínas realizada por espectrometria de massas unida a essas duas técnicas descritas anteriormente (2D-PAGE/MS, LC/MS), alcança uma visão global da expressão gênica em relação aos níveis de proteína, possibilitando comparar perfis de expressão proteica em diferentes condições, e, ainda, permitindo também detectar e caracterizar proteínas de interesse (RUPP, 2004; PITARCH et al. 2003). O espectrômetro de massas é um instrumento que permite a separação de acordo com a razão massa/carga (m/z) dos íons na fase gasosa das amostras. Os espectrômetros são amplamente utilizados para medir, por exemplo, a massa molecular de polipeptídeos ou para determinar a sequência de aminoácidos e modificações presentes nestes peptídeos e/ou proteínas. Esta técnica é capaz de fornecer de forma rápida, precisa e sensível a massa de compostos como proteínas e peptídeos (DOMON e AEBERSOLD, 2006).

Um espectrômetro de massas engloba quatro componentes principais: uma fonte de ionização para a formação de íons, um analisador de massas onde os íons formados são

separados de acordo com sua razão massa/carga, um detector e um sistema de aquisição dos dados. Fontes de ionização como MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) e ESI (*Electrospray Ionization*) tem sido amplamente utilizadas em análises de biomoléculas. Na fonte de ionização do tipo MALDI (Figura 4), a amostra é co-cristalizada com uma matriz, geralmente ácido orgânico aromático de baixo peso molecular (como ácido α -ciano-4-hidroxinâmico e o ácido sinapínico), que absorve a energia de um laser e transfere essa energia para a amostra, propiciando sua ionização e dessorção (DOMON e AEBERSOLD, 2006). É uma técnica muito sensível e apresenta maior tolerância à presença de contaminantes, como sais e detergentes.

Figura 4: Fonte de ionização MALDI – Ionização da mistura amostra/matriz (BRUKER, 2013a).

Na fonte de ionização do tipo ESI (Figura 5) a amostra líquida é submetida a uma diferença de potencial elétrico formando um *spray* eletrostático, a partir do qual são produzidas gotículas carregadas que se repelem e tornam-se cada vez menores, devido a temperatura até serem dessolvatadas (CROTTI et al., 2006).

Figura 5: Fonte de ionização ESI- Ionização de amostra líquida submetida a uma diferença de potencial elétrico.

Uma das principais ferramentas de massas atuais a nanocromatografia acoplada à fonte de ionização ESI e um analisador quadrupolo-TOF (NanoLC-ESI-Q-TOF) é muito utilizada no estudo do perfil proteômico. Esta técnica permite a identificação das proteínas através da determinação da massa molecular, e da sequência de aminoácidos dos peptídeos obtidos pela digestão de uma mistura de proteínas. Devido à sua alta sensibilidade, esta técnica confere um alto grau de precisão no sequenciamento de peptídeos fornecendo informações mais detalhadas sobre modificações pós-traducionais (BATEMAN et al., 2002). Desta forma, a espectrometria de massas é uma técnica eficaz no mapeamento global das modificações protéicas, cuja identificação se dá através da comparação das sequências obtidas com os bancos de dados utilizando ferramentas de bioinformática. Estas ferramentas possuem uma função chave para a pesquisa proteômica, pois fornecem informações sobre a sequência e funções das proteínas, localização subcelular, modificações pós-traducionais, domínios, sítios e estrutura bem como homologia com outras proteínas (PITARCH et al., 2003).

3.4.3 Aplicações proteômicas

A proteômica possibilita uma abordagem mais dinâmica na investigação de sistemas biológicos, sendo utilizada para amplificar as informações sobre a síntese e degradação de proteínas em situações específicas, nas modificações pós-traducionais e interações entre proteínas (HAN et al., 2010).

As modificações na cadeia polipeptídica podem ocorrer através da adição de grupos químicos tais como metila, acetila, sulfato, glicídios, fosfato ou uma protease (HAN et al., 2010). Em biotecnologia industrial, a análise proteômica de microrganismos é aplicada no monitoramento de alterações celulares durante a expressão de proteínas heterólogas, na identificação de limitantes de velocidade nas vias metabólicas, no desenvolvimento de cepas mais eficientes, na produção de bioprodutos de interesse e na busca de novas enzimas e promotores.

O estudo proteômico também é largamente aplicado na comparação do perfil proteico de microrganismos submetidos à diferentes condições experimentais (temperatura, nutrientes, pH, estresse químico- metais tóxicos) a fim de caracterizar a resposta ao estímulo ambiental (HAN et al., 2010). Os diferentes estímulos aplicados aos microrganismos alteram as propriedades físico-químicas das proteínas, e, conseqüentemente, suas funções no metabolismo tais como a localização celular e interações com outras biomoléculas.

A caracterização de proteínas intra e extracelular pode fornecer novas informações sobre a fisiologia fúngica (HAERBURG e KOTHE, 2010). Particularmente, a investigação das alterações no proteoma e metaboloma induzidas por metais é identificada pelo termo metaloproteômica (HAERBURG e KOTHE, 2010).

Metaloproteômica é um campo emergente que visa analisar proteínas de microrganismos submetidos à estresse por íons metálico, aumentando a compreensão do funcionamento desses organismos e possíveis aplicações biotecnológicas, como biorremediação e identificação de biomarcadores (ZHAO e POH, 2008). Ainda existem poucos trabalhos na literatura descrevendo a relação entre as proteínas super ou subexpressadas por microrganismos submetidos à uma determinada condição de estresse. Tsekova, (TSEKOVA et al. 2001) estudou o aumento da atividade da fosfatase ácida extracelular, quando o fungo *A.niger* foi submetido ao estresse oxidativo através da presença

de 2 mM de íons cobre II no meio. Alterações proteômicas no fungo *Trichosporon asahii* na presença dos compostos como arsenito de sódio (NaAsO_2) e cloreto de cádmio (CdCl_2) foram verificadas no perfil metabólico do fungo, junto à redução de proteínas como fosfogliceratoquinase, fator de alongação 2 e proteínas de choque térmico como HPS 70 (ILYAS, 2014).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolamento e manutenção das linhagens fungicas.

As linhagens de fungos foram isoladas a partir de solo e água da lagoa de rejeito da Mina do Sossego localizada em Canaã dos Carajás no Pará, por pesquisadores do CEPEMA – POLI-USP e ICB – USP. As espécies foram mantidas em tubos de ensaio com meio *Potato Dextrose Agar* (PDA: Amido de Batata – 4 g/L, Dextrose – 20 g/L, Agar – 15 g/L) a 25° C. A localização aproximada da região de coleta dos materiais é apresentada na Figura 6.

Figura 6: Mapa de localização da lagoa de rejeito - Mina de Sossego - Canaã dos Carajas- PA.

Fonte: Google Earth (23/02/2018)

4.2 Padronização do Inóculo

Para a padronização do inóculo, ambos os fungos foram cultivados por 15 dias em frascos erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio PDA a 25 °C para promover a formação de esporos. Os esporos foram coletados utilizando uma solução salina 0,9% (NaCl-PA) e sua concentração celular foi determinada pela contagem numa câmara de Neubauer observada através de um microscópio óptico. Diversas alíquotas contendo 10^6 esporos/mL

foram congeladas em frascos de 2 mL em solução de glicerol (20%) e armazenadas em *ultrafreezer* (-80 °C).

4.3 Avaliação da tolerância dos fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC ao cobre em fermentação semi-sólida e submersa.

4.3.1 Avaliação da tolerância dos fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC ao cobre em fermentação semi-sólida

A fermentação em meio semi-sólido foi utilizada com o objetivo de verificar a tolerância (crescimento celular) dos fungos *A.niger* VC e *Rhizopus microsporus* VC provenientes da mina de Sossego e expostos à íons metálicos Cu^{+2} . Os estudos foram realizados em placas, com meio PDA sintético, às quais foram adicionadas diferentes concentrações de uma solução estoque de sulfato de cobre (4.000 mg/L de íons Cu^{+2}) afim de se obter concentrações finais de 50, 100, 200, 400, 800 e 1200 mg/L de íons cobre. Como controle, foi preparada uma placa sem a presença do metal. As concentrações de íons Cu^{2+} utilizadas foram estabelecidas se baseando nas concentrações de cobre registradas nos diferentes pontos da lagoa de rejeito (concentração máxima 1200 mg/L).

Após a solidificação do meio de cultura na ausência e na presença de cobre nas concentrações estudadas, as placas foram inoculadas com 100 µL de uma solução contendo 10^6 esporos / mL, e incubadas a 30°C e observadas por 15 dias. O teste foi realizado em triplicata, totalizando 21 placas para cada espécie. Nesta etapa, foi possível observar qual a concentração mínima inibitória (MIC) que permite o crescimento do fungo, por verificação visual e registro fotográfico.

4.3.2 Avaliação da tolerância dos fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC ao cobre em fermentação submersa

Os fungos foram cultivados a 30 °C em uma incubadora com agitador orbital, utilizando frascos erlenmeyer de 500 mL e meio *Potato Dextrose* (PD - Potato Dextrose - Amido de Batata: 4,0 g/L e Dextrose: 16 g/L). O fungo *A.niger* VC foi incubado em 200 mL de meio por 140 horas sob agitação de 250 rpm, na ausência e presença de 50 mg/L de Cu^{+2} , e o fungo *R.microsporus* VC foi incubado em 100 mL de meio durante 90 horas com uma

rotação de 150 rpm.

Nos cultivos em frascos agitados, a determinação da concentração celular média foi calculada através da relação de massa seca com o volume do cultivo. Volumes conhecidos de amostra foram coletados, as amostras foram filtradas com auxílio de um sistema a vácuo (Sartorius Stedim Biotech S.A), através de uma membrana de ésteres de celulose com diâmetro de 0,45 µm (Merck Millipore), previamente seca em micro-ondas potência a 180 W por 15 min e pesada. Após filtragem as membranas contendo as amostras foram novamente secas em micro-ondas utilizando as mesmas condições anteriores (OLSSON e NIELSEN, 1997), e pesadas em balança de precisão (Shimadzu Corp AUW220D).

A quantificação celular foi calculada através da diferença entre as massas das amostras conforme mostra a Equação 1.

Equação 1: Cálculo da concentração celular da massa seca das células.

$$X = \frac{(M_s - M_m)}{M_a} \times D \quad (1)$$

Onde:

X = concentração celular da amostra (g/L);

M_s = massa da membrana contendo a massa seca de célula (g);

M_m = massa da membrana seca (g);

M_a = massa da amostra (g);

D = densidade da amostra (considerou-se 1000 g/L)

4.4 Ensaios de adsorção em batelada para remoção de Cu (II)

O ensaio de remoção de íons Cu²⁺ foram realizados durante o crescimento celular nos cultivos dos fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC contendo 50 mg/L de cobre. O cultivo foi realizado segundo o item 4.3.2.

Os experimentos para a análise de remoção do íon metálico foram realizados em batelada. Os tempos de incubação, determinados a partir das curvas de crescimento, foram

estabelecidos em 72 e 90 horas para *A.niger* VC, e em 48 e 60 horas para a *R.microsporus* VC. Em seguida, as culturas foram filtradas (0,22 micra-Millex) e a concentração de íons cobre presente no meio de cultivo foi determinada pela medida da energia de dispersão em um espectrômetro de fluorescência de raios-X (EDX-Epsilon 3 Panalytical). Neste caso, foi utilizado um substrato com baixo teor de nutrientes (meio PD) para o desenvolvimento de microrganismos, o que facilita o crescimento de forma mais espalhada, aumentando assim a superfície de contato líquido-célula (CORREA e BENTO, 2010; DHANKHAR, 2011).

4.5 Extração de proteínas e preparação do extrato proteico dos fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC em fermentação submersa.

As análises proteômicas das cepas *A.niger* VC e *R.microsporus* VC foram feitas utilizando cultivos em meio PD na ausência e na presença de íons Cu^{2+} . As células foram lavadas com água deionizada, liofilizadas e maceradas (pó). Aproximadamente 2 mg de biomassa de cada amostra foram pesados, às quais foram adicionados 50 μL de ácido fórmico 70% (Sigma Aldrich - LC-MS Ultra-98%), sob agitação em vórtex por 2 minutos, seguido da adição de 50 μL de acetonitrila. A solução foi mantida em banho ultrassônico por 15 minutos, com intuito de facilitar a extração das proteínas, e em seguida as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 17.400 g.

Para determinação da concentração do extrato bruto de proteínas foi utilizado o reagente de Bradford (Sigma Aldrich) e albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A leitura das absorbâncias foi realizada em um espectrofotômetro UV-vis - λ 595 nm (modelo UV2600 –marca Shimadzu) (SEDMAN e GROOSBER, 1977). Após a quantificação, os extratos protéicos dos fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC, cultivados em presença e ausência de cobre, foram aliquotados em microtubos de 250 μL (Eppendorf) contendo 50 mg de proteína/mL de solução, as quais foram secas em centrífuga a vácuo para posterior digestão enzimática.

4.6 Digestão do extrato protéico para análise por nanoLC-ESI-Q-TOF

A digestão do extrato protéico foi realizada por dois protocolos:

- 1) Digestão Tríptica: A enzima tripsina (Sigma) foi solubilizada em 400 μL de bicarbonato de amônio 50 mM (NH_4HCO_3) visando concentração final de 0,05

µg de enzima/µL. Ao extrato protéico foram adicionados 50 µL da solução (1:50 / enzima/proteína), e incubados à 37°C por 24 horas. Após esse período, o processo de digestão foi interrompido pela adição de 10 µL de ácido trifluoroacético 10% e a solução foi mantida por 90 minutos a 37°C. As amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 17.400 g a temperatura de 6 °C, e o sobrenadante contendo as proteínas digeridas foi analisado.

- 2) Digestão Quimotríptica: A enzima quimotripsina (Roth) foi solubilizada em 1 mM de ácido clorídrico (HCl) visando uma concentração de 0,5 µg de enzima/µL. Ao extrato protéico foram adicionados 50 µL da solução contendo quimotripsina (1:50 / enzima:proteína), e incubados a 25°C por 24 horas. O processo de digestão foi então interrompido pela adição de 10 µL de ácido trifluoroacético 10% e a solução foi mantida por 90 minutos a 25 °C. As amostras foram centrifugadas por 30 minutos à temperatura de 6°C a 17.400 g e o sobrenadante contendo as proteínas digeridas foi analisado.

4.7 Identificação das proteínas pela técnica NanoLC-ESI-Q-TOF

A identificação das proteínas foi realizada através da técnica de nanocromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas utilizando um sistema NanoLC-ESI-Q-TOF (nano LC modelo UltiMate 3000 da Thermo Scientific e ESI-Q-TOF modelo Impact II da Bruker Daltonics), contendo fonte de ionização captivespray e analisador de massas do tipo quadrupolo tempo de voo (TOF). As proteínas digeridas foram separadas em nanocoluna PepMap (C18, partículas de 5 µm, tamanho dos poros de 300 Å, 15 cm de comprimento, 75 µm de diâmetro interno; Thermo Scientific), utilizando um gradiente de 3 a 97% (v/v) de acetonitrila (Sigma-Aldrich) contendo 0,1 % de ácido fórmico, durante 180 min à vazão de 0,3 µL/min.

O instrumento foi operado com ionização no modo positivo e os espectros dos íons precursores (MS) foram adquiridos na faixa de 50-3000 m/z com uma frequência de aquisição de 2 Hz, voltagem do capilar em 1,5 kV, temperatura da fonte em 150 °C, fluxo do gás de secagem de 3 L/min e pressão do nebulizador de 0,2 bar. Os espectros de fragmentação dos íons precursores (MS/MS) foram adquiridos com uma frequência de aquisição de 4 a 16 Hz e

energia de colisão entre 23 e 65 eV. Os espectros de massas obtidos foram integrados e processados utilizando o software PEAKS Studio 8.5.

4.8 Processamentos dos dados e identificação de proteínas

Os arquivos de dados (.d) obtidos das análises NanoLC-MS/MS foram importados para o software PEAKS Studio 8.5 (Bioinformatics Solution Inc., Waterloo, Canadá) e os espectros MS/MS foram submetidos à análise através da busca no banco de dados usando peaksDB, PTM e Spider (ZHANG et al., 2012). Uma vez que o fungo *R.microsporus* VC (isolado) é filogeneticamente diferentes dos outros fungos (WU et al., 2003) e tem uma base de dados de proteínas não curadas, e *A.niger* apresenta um número baixo de proteínas curadas em seu banco de dados, os peptídeos sequenciados *de novo* com pontuação média de confiança local (ALC) $\geq 50\%$ foram submetidos ao banco de dados Uniprot/ TrEMBL, onde são descritas 49.897 sequências para espécie *R.microsporus* (baixadas em agosto de 2017) e banco de 36.152 sequências para espécie *A.niger* UniprotKB (baixadas em setembro de 2017).

Os parâmetros de entrada foram configurados da seguinte forma: tolerância de massa de precursor de 20 ppm (MS), tolerância de massa de fragmento de 0,025 Da (MS/MS), tripsina ou quimotripsina como enzima específica em uso, máximo de duas falhas de clivagem, Cys carbamidometilação (+57.02 Da) como modificação fixa e Met oxidação (+15.99 Da) como modificação variável. As taxas de descoberta falsa (FDRs) para proteínas e peptídeos foram fixadas em um máximo de 1%. Todas as proteínas identificadas têm pelo menos 01 peptídeo único.

Com o intuito de obter informações sobre as funções das proteínas, papel biológico e suas relações no mapa de reações bioquímicas, os conjuntos de dados proteômicos apresentados foram analisados utilizando ferramentas de bioinformática que operam sobre algoritmos relacionados com a evolução de sequências proteicas, e, que dotados de um banco de dados abrangente possam fornecer tais informações. Este recurso bioinformático inclui informações sobre as vias de regulação metabólica, famílias e subfamílias de genes, função molecular, processo biológico e componente celular (BANCI et al., 2011).

A ontologia genética (GO) é uma importante ferramenta de bioinformática com características de genes em todas as espécies, e pode ser dividida em componente celular, função molecular e processos biológicos. Neste estudo as análises de proteínas identificadas

foram realizadas pelo sistema de classificação Uniprot - The universal protein knowledgebase (THE UNI CONSORTIUM^{1,2,3,4}, 2017).

4.9 Desenho experimental da análise proteômica.

Como descrito anteriormente, a proteômica tem sido empregada amplamente nos estudos de microrganismos aplicados em processos de bioremediação, por ser uma técnica efetiva na identificação de proteínas relacionadas a adsorção de íons metálicos e identificação de possíveis biomarcadores ambientais.

A Figura 7 representa o fluxograma dos processos envolvidos no estudo proteômico dos fungos.

Figura 7: Fluxograma das etapas de análise proteômica dos fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC.

5 RESULTADOS

5.1- Avaliação da tolerância dos fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC ao cobre em meio, semi-sólido e submersa.

Em geral, a inerente robustez dos processos biotecnológicos exige um significativo controle de todas as etapas de produção, pois pequenas variações podem resultar em grandes diferenças nos bioprocessos (e.g rendimento, tempo). Consequentemente, diferentes tipos de fermentação (e.g estado sólido ou líquido) apresentam significativa diferença, mesmo quando os processos são semelhantes (microrganismo, fonte de carbono, temperatura, etc). Processos de fermentação microbiana têm sido estabelecidos como uma poderosa ferramenta para a produção de diferentes compostos orgânicos (eg. enzimas, ácidos orgânicos) devido ao seu baixo custo, eficácia e vantagens ambientais (DEY *et al.*, 2016).

Chang, (CHANG *et al.* 2014) estudou a aplicação de fungos na degradação de substâncias tóxicas como bisfenol A, bisfenol F, nonilfenol e tetrabromobisfenol, responsáveis pela desregulação endócrina. A utilização do fungo *Pleurotus eryngii* em fermentação submersa e sólida, mostrou que a taxa de remoção de produtos químicos tóxicos utilizando o fungo *P.eryngii* apresentou maior eficiência na fermentação semi-sólida. Das, (DAS *et al.* 2015) estudou a produção de ácido fumárico através da fermentação submersa e sólida, utilizando o fungo *R.oryzae* e resíduos de celulose de diferentes tamanhos de partícula. Neste caso, observou-se maior produção de ácido fumárico na fermentação submersa de $23,47 \pm 0,7$ g/L em 48 horas de cultivo, enquanto a fermentação sólida produziu 41,65 g de ácido fumárico/ kg de peso seco do sólido em 21 dias.

A fermentação sólida ou semi-sólida vem se destacando como uma técnica promissora na produção enzimática, pois imita o habitat natural dos fungos filamentosos e permite a utilização de matéria prima de baixo valor agregado ou resíduos sólidos (ALI e ZULKALI, 2011). No entanto, a fermentação submersa é o método preferido da indústria, devido ao melhor controle de parâmetros como agitação, temperatura, aeração, espuma, pH, entre outros fatores importantes na produção enzimática (HANSEN *et al.*, 2015). Tendo em vista os trabalhos reportados na literatura, no presente estudo, a tolerância à presença de cobre foi avaliada em função do tipo de fermentação (em estado semi-sólido e submersa).

5.1.1 Avaliação da tolerância do *A.niger* VC e *R.microsporus* VC ao cobre em fermentação semi-sólida (Toxicidade em placas)

Muitos íons metálicos têm influência direta sobre o processo fisiológico e bioquímico de microrganismos. O crescimento, que reflete o metabolismo celular, tem sido usado como indicador chave na toxicidade de metais pesados para microrganismos (URUNAKUMARA e XUECHENG, 2008).

Com o objetivo de se verificar a tolerância dos fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC ao íon metálico Cu^{+2} , foram realizados estudos de crescimento dos fungos em meio sintético PDA (fermentação sólida) com concentrações finais de 50, 100, 200, 400, 800 e 1200 mg/L de íons Cu^{+2} . As Figuras 8 e 9 apresentam fotos das culturas em placa após 15 dias de incubação dos fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC, respectivamente. Pôde-se observar que não houve inibição da fase germinativa do fungo pelo metal em concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg/L no período de 15 dias para a cepa *A.niger* VC, entretanto, para o fungo *R.microsporus* VC foi observada a inibição germinativa em concentrações acima 200 mg/L de íons Cu^{2+} .

Verificou-se que em ambos os cultivos o processo germinativo, crescimento de hifas e consequentemente formação de micélios deu-se de forma mais lenta nos fungos após exposição ao metal, sugerindo modificação no metabolismo dessa espécie em concentrações mais elevadas de cobre. As imagens das placas onde os crescimentos foram totalmente inibidos não estão sendo apresentadas.

Figura 8: Placas inoculadas com esporos de *A.niger* VC em meio de cultivo PDA após 15 dias: (A) Sem cobre. (B) 50 mg/L de cobre. (C) 100 mg/L de cobre. (D) 200 mg/L de cobre. (E) 400 mg/L de cobre.

Figura 9: Placas inoculadas com esporos de *R.microsporus* VC no meio de cultivo PDA após 15 dias: (A) Sem cobre. (B) 50 mg/L de cobre. (C) 100 mg/L de cobre. (D) 200 mg/L de cobre.

De acordo com os resultados apresentados acima, tanto o *A.niger* VC como o *R.microsporus* VC apresentaram maior inibição na fase germinativa quando expostos às maiores concentrações de Cu^{2+} . Os resultados corroboram com a literatura que reporta, que o cobre é um elemento essencial para o metabolismo do fungo, no entanto, quando presente em altas concentrações inibe a atividade germinativa, como observado para o fungo *A.niger* VC em concentrações superiores a 400 mg/L de cobre e para o *R.microsporus* VC em concentrações acima de 200 mg/L (ANAHID et al., 2011).

5.1.2 Curva de Crescimento e Quantificação da Concentração Celular - Fermentação submersa

Com a avaliação da tolerância dos fungos em presença de íons cobre através do processo de fermentação semi-sólida, foram estimadas concentrações de 50, 100, 200 e 400 mg/L de íons Cu^{2+} para os testes em meio líquido (fermentação submersa) a fim de determinar a melhor concentração de trabalho para as duas espécies. Na fermentação submersa foi observada a MIC em 50 mg/L de íons Cu^{2+} para o fungo *R.microsporus* VC, enquanto para o fungo *A.niger* VC a MIC foi de 200 mg/L de íons Cu^{2+} . A partir dos dados observados na fermentação submersa foi definida a concentração de 50 mg/L de íons Cu^{2+} para este estudo, pois acima desta concentração não foi observado crescimento celular do fungo *R.microsporus* VC após 168 horas de incubação.

O padrão de crescimento do fungo *A.niger* VC foi determinado em células cultivadas em meio potato dextrose (PD) controle e na presença de 50 mg/L de íons Cu^{2+} (Figura 10). As células de controle mostraram a fase de adaptação e o crescimento acelerado, atingindo a fase estacionária em aproximadamente 140 h. Em contraste, foi observada uma pequena inibição do crescimento celular pelo tratamento com cobre, contudo a fase estacionária não foi alcançada. A taxa de crescimento celular foi 14,63% menor quando o fungo foi tratado com metal, sugerindo maior resistência da espécie *A.niger* VC a exposição aos íons cobre.

Figura 10: Curva de crescimento celular do fungo *A.niger* VC (●) ausência de cobre, (■) 50mg/L de Cu^{2+} .

Ao comparar o padrão de crescimento do fungo *R.microsporus* VC, cultivados em meio PD (controle e presença de 50 mg/L de Cu^{2+}), Figura 11, as células do controle apresentam crescimento celular acelerado, atingindo a fase estacionária em aproximadamente 70 horas. Em contraste, o cultivo na presença do metal foi observado inibição do crescimento celular do fungo *R.microsporus* VC, atingindo o início da fase estacionária em aproximadamente 50 horas de cultivo. Foi observada a redução de 65,14% do crescimento celular em presença do agente oxidante, sugerindo menor resistência da espécie a íons cobre.

Figura 11: Curva de crescimento celular do fungo *R.microsporus* VC (●) ausência de cobre, (■) 50mg/L de Cu^{2+} .

5.2 Ensaaios de adsorção em batelada para remoção Cu^{2+}

Este estudo foi realizado a fim de determinar o poder de adsorção de cobre pelos fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC em dois pontos da curva de crescimento celular e através destas análises, foi possível determinar os pontos de coleta para realização da análises proteômicas. Através da análise proteômica, é possível observar modificações do metabolismo fungico após exposição a íons cobre.

Para análise de adsorção foram escolhidos os pontos de 72 e 90 horas de cultivo do fungo *A.niger* VC e o tempo de 48 e 60 horas para *R.microsporus* VC. O resultado dos experimentos individuais para os fungos estudados são apresentados na Figura 12, onde é possível observar o comportamento da remoção de íons cobre do meio em função crescimento celular em presença do íon metálico. No caso da adsorção do metal pelo fungo *A.niger* VC, cultivado no meio PD contendo 50 mg/L de íons Cu^{2+} , nos pontos de 72 e 90 horas foi observada uma remoção de 31 mg/L em 72 horas de cultivo, e 18,7 mg/L em 90 horas, sendo o percentual de adsorção realizada pela biomassa fúngica, 62,0 % e 37,4 %, respectivamente.

Para o fungo *R.microsporus* VC nos tempos de 48 e 60 horas de crescimento celular em meio PD contendo 50 mg/L de íons Cu^{2+} , e foram removidos 22,5 mg/L e 21,8 mg/L, sendo observada uma pequena redução na porcentagem de adsorção do íons metálico 45,0 % e 42,7%, respectivamente.

Figura 12: Adsorção de íons Cu^{2+} no cultivo dos fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC em 50 mg/L.

Os dados obtidos a partir da adsorção foi determinada os tempos de coleta de material de 72 h para fungo *A.niger* VC e 48 h para *R.microsporus* VC para a realização das análise proteômica.

5.3 Análises Proteômicas das espécies

Os efeitos da exposição ao cobre no proteoma dos fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC foram investigados por abordagem proteômica qualitativa de identificação das proteínas realizada através da técnica nanoLC-ESI-Q-TOF.

Para identificar e caracterizar o perfil proteômico dos fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC em resposta a exposição aos íons Cu^{2+} , foram utilizados os tempos de cultivo de 72 horas para a espécie *A.niger* VC e 48 horas para a espécie *R.microsporus* VC (item 4.3.2), sendo realizado o estudo proteômico nestes pontos por apresentar maior absorção dos íons metálicos. O diagrama de Venn é o modo usual para avaliar a distribuição protéica entre os cultivos, bem como as proteínas comuns (sobreposição) aos cultivos estudados.

5.3.1- *Aspergillus niger* VC

A análise quantitativa da expressão protéica do fungo *A.niger* VC revelou um total de 1608 proteínas identificadas em pelo menos duas repetições, sendo 1476 proteínas identificadas no cultivo em ausência de cobre e 1352 proteínas no cultivo contendo os íons metálicos, este resultado mostra uma redução de aproximadamente 17% no número de proteínas expressas no cultivo contendo os íons Cu^{2+} , A partir do diagrama de Venn (Figura 13) do fungo *A.niger* VC, observou se 1220 proteínas comuns aos dois cultivos (ausência e presença de cobre).

Contudo, apenas 132 proteínas foram expressas exclusivamente no meio contendo íons metálicos. Apesar do fungo *A.niger* VC não apresentar grande alteração no crescimento celular, provavelmente devido à resistência ao metal, a diferença na expressão protéica ocorre possivelmente em consequência da ativação da resposta ao estresse oxidativo que permite a sobrevivência e crescimento celular.

Figura 13: Diagrama de Venn do perfil proteômico da espécie *A.niger* VC: 72 horas de incubação em meio PD: (A) ausência de cobre; (B) presença de cobre.

As 1220 proteínas comuns mostradas no diagrama de Venn representam principalmente proteínas relacionadas ao metabolismo basal do fungo (77,8%). As proteínas mais representativas no fungo *A.niger* VC nos diferentes cultivos foram identificadas de acordo com o número de peptídeos, sendo elas a proteína *NACHT domain protein*, *translation elongation factor 2*, *fatty acid synthase beta subunit*, *pyruvate carboxylase*, *Aspergillus niger genomic contig*, *An04c0090*, *heat shock protein sspB-Aspergillus niger* e *ATP synthase subunit beta*. Comparando as proteínas expressas na ausência e presença de cobre, foram

identificadas diferentes proteínas (Tabela 1), mostrando a diferença das respostas do metabolismo celular após a exposição ao estresse oxidativo.

Tabela 1: Dez principais proteínas identificadas com maior número de peptídeos em condições diferentes de cultivo do fungo *A.niger* VC.

Nº de acesso	-10logp	Cobertura (%)	Peptídeos	Proteínas
Ausência				
A0A117DYT5	44342	52	37	Cobalamin-independent methionine synthase
A0A100IED2	42355	46	36	Elongation factor 2-oxoglutarate dehydrogenase
A0A117DXF8	41556	34	26	E1 component
A0A117E173	34101	38	22	Hsp70 chaperone
A0A100IAD1	34517	25	16	Aminopeptidase C
A0A100IFA7	30427	22	13	Aconitase family protein
A0A124BUR9	24060	6	13	Glycogen debranching enzyme Gdb1
A2QUW9	24336	38	12	Aspergillus niger contig An10c0020, genomic contig (EC 1.1.1.-)
A2R8S1	28850	21	12	Aspergillus niger contig An16c0250, genomic contig (EC 3.4.14.-)
A0A100IA47	25819	15	12	Bifunctional purine biosynthesis protein Ade16
Presença 50 mg/L Cu²⁺				
G3XZT4	39087	46	25	Uncharacterized protein
D7GAW3	36317	57	17	Translation elongation factor 1-alpha (Fragment)
A0A100INN3	26592	36	14	14-3-3 protein
I7B155	25053	53	12	Calmodulin (Fragment)
A2R121	28732	39	11	Aspergillus niger contig An12c0380, genomic contig (EC 1.3.1.-)
A0A100IQ03	27053	35	10	NADH-ubiquinone oxidoreductase 39 kDa subunit
A2R8G7	26480	37	8	Aspergillus niger contig An16c0230, genomic contig (EC 1.1.1.100)
A5ABB4	21941	24	7	Aspergillus niger contig An08c0230, genomic contig (EC 1.1.1.91)
A0A100IPI0	17412	18	7	Heat shock protein 60
A0A100IU47	25347	25	7	Norsolorinic acid reductase

Dentre as proteínas comuns aos cultivos na ausência e na presença de íons Cu^{2+} , podemos destacar a presença de proteínas características de condições de estresse, como *serine/threonine-protein phosphatase*, relacionadas à conformação das organelas e componentes do proteossoma, proteínas mitocondriais como *cytochrome c oxidase subunit 2*, *cytochrome b-c1 complex subunit 7*, proteases de pré-equivalência mitocondrial, e *pyruvate carboxylase*.

Em Ontologia Genética (GO, do inglês *Gene Ontology*), a função molecular detalha as reações a nível molecular, vinculadas às atividades catalítica, transporadoras e antioxidantes. A análise dos dados mostrou 10 funções moleculares na ausência e presença de 50 mg/L de íons Cu^{2+} , sendo elas, ligação, reguladora enzimática, reguladora de transcrição, peroxidases, receptora, molécula estrutural, transdutora de sinais, catalítica, superóxido desmutase, proteínas marcadoras (*protein tag*), fosforilação, transportadora de oxigênio e transportadora.

Na comparação das funções moleculares das diferentes proteínas expressas nos cultivos do fungo *A.niger* VC na ausência (Figura 14) e presença de íons cobre (Figura 15), observa-se uma redução de 7,1% nas proteínas relacionadas às atividades catalítica redução de 56 para 52% e de 50% nas proteínas de atividade reguladora enzimática redução de 2 para 1% em condições de estresse por cobre. Proteínas com funções de atividades transdutora de sinal, peroxidases e moléculas estruturais também não foram identificadas na condição de estresse. Observou-se em presença de cobre, abundância na expressão de proteínas com atividade de ligação (13,9%), e expressão de proteínas com atividades superóxido dismutase, transportadora de oxigênio e reguladora de transcrição (ligação de proteínas ao DNA).

Figura 14: Função Molecular no fungo *A.niger* VC na ausência de cobre (Uniprot, <http://www.uniprot.org>).

Figura 15: Função Molecular no fungo *A.niger* VC em presença de cobre (50 mg/L Cu^{2+}) (Uniprot, <http://www.uniprot.org>).

Dentre as funções moleculares identificadas na ausência do agente oxidante, foram identificadas duas classes protéicas, que expressaram somente uma proteína para cada função, sendo elas: função molecular correspondente a atividade do fator de transcrição da RNA polimerase II, ligação de DNA específica de sequência, identificando a proteína *Aspergillus*

niger genomic contig, An07g08100, e uma proteína com função de marcação denominadas *protein tag* como *Aspergillus niger contig, An08g02950*, cuja função molecular está relacionada ao processo de fosforilação em resposta à interações químicas ou mudanças ambientais.

Nas proteínas relacionadas às funções moleculares identificadas em ambos os cultivos, não foram observadas alterações expressivas na porcentagem de proteínas com atividade catalítica, atividade transportada e atividade reguladora enzimática. Contudo, proteínas com funções com atividade transdutora de sinal, molécula estrutural e peroxidases não foram identificadas nos cultivos contendo cobre.

Dentre as 132 proteínas expressas exclusivamente no cultivo em presença de cobre, observou-se um aumento de 13,9% nas proteínas de ligação, quando comparado ao cultivo na ausência de cobre. Proteínas de ligação como *calmodulin*, *NADH: flavin oxidoreductase*, *1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase*, *14-alpha sterol demethylase Cyp51B* foram expressas em presença de cobre. Também foi observada expressão de oxidoreductase (atividade catalítica), como aldo-ceto redutase, NADH-flavina oxidoreductase e NADH-oxidase, proteínas que catalisam a reação oxidação-redução (redox), alterando assim o estado intracelular.

No entanto, as proteínas de choque térmico (HSPs) diferencialmente expressas foram encontradas em maior proporção na ausência do metal, quando comparadas as HSPs identificadas na presença de Cu^{2+} (Tabela 2).

Tabela 2: Identificação de HSPs diferencialmente expressas em *A.niger* VC após incubação em presença e ausência de íons Cu^{2+} .

Nº de acesso	Proteínas	-10lgP	Peptídeos	Cultivo
A0A100I2M0	Mitochondrial protein import protein Mas5	8923	3	(0)
A0A100IN43	Survival factor 1	11767	4	(0)
A0A100ITR6	DnaJ domain protein	6887	1	(0)
A0A117DZ14	T-complex protein 1, alpha subunit	8187	1	(0)
A2QQ88	Mitochondrial import innermembrane translocase subunit TIM44	6650	1	(0)
A0A124BXP0	Cytochrome P450 alkane hydroxylase	9409	2	(0)
A0A100IK26	Cytochrome P450 monooxygenase	19784	3	(0)
A0A117DZ55	Aha1 domain family	8367	2	(0)
A0A117E173	Hsp70 chaperone	34101	22	(0)
A0A100INN3	14-3-3 protein	26592	14	(1)
A0A124BY48	LMBR1 domain protein	6108	1	(1)
A2QIV5	Superoxide dismutase (Cu-Zn)	5064	1	(1)
A0A100IPI0	Heat shock protein 60	17412	7	(1)
Q6A596	Heat shock protein	27818	15	(1)

Legenda: proteínas expressas: ausência de Cu^{2+} (0), presença de Cu^{2+} (1)

Nota-se que em condições de estresse, ocorre redução na expressão de proteínas relacionadas à mitocôndria, enquanto aumentam significativamente as proteínas HSP, catalase e catalase-peroxidase. Proteínas como *HSP*, *HPS 60* e *superóxido desmutase* geralmente abundantes sob o estresse de cobre (FENG, 2017) foram identificadas em presença do metal. Contudo, devido à resistência apresentada pelo fungo *A.niger* VC não foram observadas maiores expressões de proteínas de choque térmico. Na Tabela 3 são apresentadas proteínas diferencialmente expressas em presença de cobre.

Tabela 3: Proteínas diferencialmente identificadas por espectrometria de massas do fungo *A.niger* VC em presença de íons Cu^{2+} (Uniprot, <http://www.uniprot.org>).

Nome	Nº de acesso	Massa (Da)	Função
Resposta ao estímulo			
<i>Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1)</i>	A2QIV5	25274	Cataliza a dismutação do superóxido.
<i>Heat shock protein 60 (mitochondrial)</i>	A0A100IPI0	61846	Restaurar a atividade biológica de uma proteína desdobrada usando proteínas auxiliares, como chaperones.
<i>Heat shock protein (70 family)</i>	Q6A596	66884	Atua na interação seletiva e não covalente com ATP.
<i>LMBR1 domain protein</i>	A0A124BY48	125927	Atua na interação seletiva e não covalente com uma proteína chaperone.
Regulação na produção de proteínas			
<i>LSM domain family protein</i>	A0A124BW51	12839	Facilita o processamento de RNA, incluindo degradação, edição e regulação.
<i>A.niger contig An14c0130, genomic contig</i>	A2R359	86617	Atua no movimento dos nucleossoma ao longo de um fragmento de DNA.
<i>A.niger contig An01c0190, genomic contig</i>	A2Q8R5	35217	Mutação; Ligação de um complexo de proteína a um filamento de actina, evitando assim a adição, troca ou remoção de outras subunidades de actina.
<i>A.niger contig An17c0110, genomic contig</i>	A2R9R2	46585	Oxidação; Vincula e aumenta a atividade de uma enzima.
<i>A.niger contig An06c0090, genomic contig</i>	A2QLM3	64565	Atua na montagem, disposição de partes constituintes. ou desmontagem de estruturas citoesqueléticas que compreendem filamentos de actina.

<i>Multifunctional tryptophan biosynthesis</i>	P05328	82910	Atua na catálise da transferência de um grupo, por exemplo, um grupo metilo, grupo glicosilo, grupo acilo, contendo fósforo ou outros grupos, de um composto aceptor de elétron.
<i>Ferulic acid decarboxylase 1</i>	G3XWH2	58587	Cataliza a descarboxilação reversível de ácidos carboxílicos Aromáticos.
<i>Cyclin-dependent kinases regulatory subunit</i>	G3Y702	12501	Atua na modulação e atividade de uma proteína serina/treonina quinase dependente de ciclina, enzimas da família proteína quinase que são reguladas por associação com ciclinas e outras proteínas.
<i>Phospholipase (EC 3.1.4.4)</i>	A2R689	135876	Atua na célula utilizando um lípido contendo inositol para converter um sinal em uma resposta metabólica.
<i>Peptidylprolyl isomerase</i>	A2R2I4	11345	Mutação
<i>Adenosine kinase</i>	A0A100IQC1	38325	Atua na produção de nucleósido de purina de seus derivados, sem nova síntese celular.
<i>A.niger contig An09c0070, genomic contig</i>	A2QTQ4	41928	Mutação Catálise de reação de fosfato.

Legenda: As 132 proteínas expressas pelo fungo *A.niger* VC em presença de cobre encontram-se na Tabela 2 do Anexo I.

Os processos biológicos estão relacionados a uma série de eventos dentro do metabolismo celular como, por exemplo, são responsáveis por um conjunto de funções moleculares, processos metabólicos, processo celular ou resposta ao estímulo. Dentre as diferentes proteínas expressas nos diferentes cultivos, foram classificados nove processo biológico. Nos cultivos de 72 h do fungo *A.niger* VC, percebe-se redução significativa nas proteínas dos processos celulares (74,4%), metabólicos (81,5%) e localização celular (32,4%). Vale a pena notar que, mesmo na ausência de Cu^{2+} , proteínas de resposta ao estímulo foram identificadas, o que significa que os íons Cu^{2+} presentes no cultivo não foram os únicos responsáveis por este estímulo (Figura 16).

Figura 16: Processos Biológicos expressos no fungo *A.niger* VC: (■) ausência de cobre e (■) presença de Cu^{2+} (Uniprot, <http://www.uniprot.org>).

No cultivo do fungo *A.niger* VC em presença de íons cobre, além da supressão de proteínas envolvidas nos metabolismo celular, nota-se a redução de aproximadamente 90% das proteínas relacionadas com a resposta ao estímulo, como *autophagy-related protein 8*, *protein transport protein sec13*, *survival factor 1*, *Aspergillus niger genomic contig, An09c0040*, entre outras. Por outro lado, na ausência de íons cobre foi observada a proteína *S-formylglutathione hydrolase* (FGH), uma enzima chave na biossíntese de glutathione (GSH), que é o principal antioxidante endógeno gerado pelas células ($\text{S-formilglutathione} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{glutathione} + \text{formiato}$).

Dentre os processos metabólicos identificados na ausência do agente oxidante, destacam proteínas correspondentes ao metabolismo de aminoácidos, nitrogênio, carboidratos e compostos de carbono, metabolismo de lipídeos, biossíntese de vitaminas e cofatores enzimáticos, como, por exemplo, *autophagy-related protein 8*, *probable glucan endo-1,3-beta-glucosidase eglC*, *alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming]*². Estas enzimas estão relacionadas às reações e via químicas na quebra de polissacarídeos, além de proteínas que resultam na alteração da parede celular, ou dos dissacarídeos isômeros da sacarose. Funções que auxiliam na manutenção da forma estrutural da célula e protegem a lise osmótica do metabolismo fúngico (THE UNI CONSORTIUM^{1,2,3,4}, 2017). Também foi observada na ausência de íons metálicos a subexpressão de enzimas envolvidas na glicólise e gliconeogênese, como *pyruvate kinase* e *enolase*, bem como a *glutamine synthetase* e *adenosylhomocysteinase*, enzimas envolvidas no metabolismo dos aminoácidos e que estão associadas à assimilação de cobre na célula.

Enzimas da via glicolítica foram identificadas em maior concentração na ausência do metal, como por exemplo, *pyruvate kinase*, *pyruvate carboxylase*, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*, *pyruvate dehydrogenase*, *malate synthase*, *phosphoglycerate mutase*, *isocitrate lyase*. Entretanto, na presença do metal não foram identificadas proteínas da via glicolítica. A redução de enzimas pertencentes à via glicolítica, reduzem o fornecimento de ATP e intermediários, sendo afetadas em presença de cobre. Logo o estresse causado pelo cobre causa danos principalmente nas etapas catalíticas posteriores à glicólise afetando o desenvolvimento celular.

Em presença de cobre foi observada a sub expressão de proteínas responsáveis pela transferência catalítica como *acetyl-CoA-acetyltransferase*, *branched-chain amino acid*

aminotransferase, *arylamine N-acetyltransferase 2* e *Aspergillus niger genomic contig*, *An10c0050*. A presença de íons metálicos também ocasionou a sub expressão de proteínas doadoras de elétrons como *3-isopropylmalate dehydrogenase* e *Aspergillus niger genomic contig*, *An18c0170*, que associadas a um grupo glicosil contendo fósforo, transformam-se em proteínas receptoras (THE UNI CONSORTIUM^{1,2,3,4}, 2017).

Na espécie *A.niger* VC em ambos os cultivos (ausência e presença de íons Cu^{2+}), foi caracterizado um amplo repertório de proteínas em resposta à mudanças ambientais (ambiente de mina). Através dos resultados obtidos no estudo proteômico, podemos destacar as proteínas associadas a um cofator de íons metálicos, denominados metaloproteínas, onde existem ordens naturais de estabilidade para os metais divalentes. Entre as metaloproteínas expressas em ambas as culturas pelo fungo *A.niger* VC (Tabela 4), observou-se uma inibição da expressão da proteína sob condições de estresse (adição de cobre).

Tabela 4: Metaloproteínas diferencialmente expressas *A.niger* VC em presença e ausência de íons Cu^{2+} .

Nºde Acesso	Proteínas	-10lgP	Peptídeos	Classificação	Cultura
A2QIL3	<i>Aminopeptidase</i>	22978	13	Metaloprotease	(0)
A2QAJ5	<i>Dipeptidase</i>	5625	1	Metaloprotease	(0)
A2RBC2	<i>Probable carboxypeptidase, An18g06210</i>	3468	1	Metalopeptidase	(0)
A2QQ88	<i>Mitochondrial import innermembrane translocase subunit TIM44</i>	6650	1	Chaperona	(0)
A0A117DZ14	<i>T-complex protein 1, alpha subunit</i>	8187	1	Chaperona	(0)
A0A117DZ55	<i>Aha1 domain family</i>	8367	2	Chaperona	(0)
A0A100IRN1	<i>Vacuolar carboxypeptidase Cps1</i>	7979	2	Metalocarboxipeptidase	(1)
A0A124BY48	<i>LMBR1 domain protein</i>	6108	1	Chaperona	(1)
A2QIV5	<i>Superoxide dismutase</i>	5064	1	Superoxide dismutase	(1)

Legenda: proteínas expressas: ausência de Cu^{2+} (0), presença de Cu^{2+} (1)

5.3.2- *Rhizopus microsporus* VC

A análise quantitativa da expressão protéica do fungo *R.microsporus* VC revelou um total de 1459 proteínas identificadas em pelo menos duas repetições, sendo 1070 proteínas identificadas no cultivo em ausência de cobre e 1232 proteínas no cultivo contendo os íons metálicos, este resultado mostra um aumento de aproximadamente 15% no número de proteínas expressas no cultivo contendo íons Cu^{2+} . A partir do diagrama de Venn (Figura 17) o fungo *R.microsporus* VC, observou-se 843 proteínas comuns aos dois cultivos (ausência e presença de cobre)

Figura 17: Diagrama de Venn da análise proteômica da espécie *R.microsporus* VC com 48 horas de incubação em meio PD: (A) ausência de cobre; (B) presença de cobre.

Das 843 proteínas comuns aos cultivos, conforme demonstrado no diagrama de Venn, 75% delas correspondem ao metabolismo basal do fungo. As proteínas mais representativas no fungo *R.microsporus* VC nos diferentes cultivos foram classificadas de acordo com o número de peptídeos identificados, como por exemplo, *putative Fas2p*, *ATP-citrate synthase*, *pyruvate decarboxylase isozyme*, *Hsp71-like protein*, *elongation factor 1-alpha*, *fructose-bisphosphate aldolase, class II* e *ATP synthase subunit alpha*. Comparando as proteínas expressas na ausência e presença de cobre, foram identificadas diferentes proteínas (Tabela 5), mostrando a diferença das respostas do metabolismo celular após a exposição ao estresse oxidativo.

Tabela 5: Dez principais proteínas identificadas com maior número de peptídeos em condições diferentes de cultivo do fungo *R.microsporus* VC.

Nº de acesso	-10logp	Cobertura (%)	Peptídeos	Proteínas
Ausência				
A0A1X0S6B0	33618	50	16	<i>Rhizopuspepsin II</i>
A0A1X0S6C4	30395	47	14	<i>Extracellular aspartic proteinase</i>
A0A0A1MR64	27333	12	14	<i>Uncharacterized protein</i>
A0A1X0S5Y9	25394	29	7	<i>Lipase</i>
				<i>Putative V-type proton</i>
A0A0A1NIV8	21183	37	7	<i>ATPase subunit B</i>
A0A0C7BZ89	20125	16	7	<i>Uncharacterized protein</i>
A0A1X0RQ56	18045	17	6	<i>Glucoamylase 1</i>
A0A1X0RQ56	18045	17	6	<i>Glucoamylase 1</i>
A0A1X0RUE4	19543	11	6	<i>Heme peroxidase</i>
				<i>Putative Lipase</i>
A0A0A1NRG7	24819	24	6	<i>preproprotein (Precursor)</i>
Presença				
50 mg/L Cu²⁺				
A0A0A1NWB8	41161	58	30	<i>Putative Heat shock protein 70</i>
				<i>Uncharacterizedprotein</i>
A0A1X0RYW6	34513	50	18	<i>(Fragment)</i>
A0A0C7CL20	33057	24	15	<i>Putative Transketolase</i>
				<i>NAD-specificglutamate</i>
A0A1X0RNB3	19422	16	12	<i>dehydrogenase (EC 1.4.1.2)</i>
A0A0C7BPW7	25188	29	10	<i>Uncharacterized protein</i>
A0A1X0SB54	27024	28	10	<i>40S ribosomal protein S6</i>
				<i>ATP-dependent</i>
				<i>phosphofructokinase(ATP-PFK)</i>
A0A1X0S2U0	23839	12	8	<i>(Phosphofructokinase)</i>
				<i>Putative Ubiquinol-cytochrome</i>
A0A0C7B4Q9	26118	44	8	<i>reductase cytochrome c1 subunit</i>
				<i>Putative 30S ribosomal</i>
A0A0A1P1D1	20202	44	7	<i>protein S10e</i>
A0A1X0S364	24767	32	7	<i>Ribosomal protein L19</i>

Dentre as proteínas comuns a os cultivos, podemos destacar a presença de proteínas características de condições de estresse, como *Serine/threonine-protein phosphatase*, duas proteínas da família HPS-7 e HSP 60, seis proteínas da família HSP 70, duas proteínas da família HSP 90, HSP e SSB1. Observou-se também a presença de proteínas mitocondriais como *mitochondrial cytochrome c oxidase subunit*, *cytochrome b-c1 complex subunit 7*, e protease como *pyruvate carboxylase* que apresenta interação seletiva e não covalente com qualquer íons metálico. A maioria das HPS diferencialmente expressas no fungo *R.microsporus* VC foram identificadas após exposição aos íons Cu^{2+} (Tabela 6).

Tabela 6: Identificação de HSPs diferencialmente expressas em *R.microsporus* VC após incubação em presença e ausência de íons Cu^{2+} .

Nº de acesso	Proteínas	-10LgP	Peptídeos	Cultivo
A0A0A1MR01	<i>HSP20-like chaperone</i>	7692	1	(0)
A0A1X0RMA2	<i>DUF1744-domain-containing protein</i>	5664	1	(0)
A0A0C7BDR3	<i>Putative DNA polymerase</i>	6128	1	(0)
A0A0C7BZ89	<i>Uncharacterized protein</i>	20125	7	(0)
A0A0C7BF35	<i>Uncharacterized protein</i>	4961	1	(0)
A0A1X0RUE4	<i>Heme peroxidase</i>	19543	6	(0)
A0A0C7BYC4	<i>Catalase</i>	12324	2	(0)
A0A1X0RT54	<i>Catalase</i>	12324	2	(0)
A0A0A1N1T5	<i>Catalase</i>	7935	1	(1)
A0A1X0RL43	<i>Heat shock protein Hsp90</i>	11698	2	(1)
A0A0A1NWB8	<i>Putative Heat shock protein 70</i>	41161	30	(1)
A0A0C7BLY5	<i>Putative Heat shock protein 78, mitochondrial</i>	6608	1	(1)
A0A1X0S643	<i>DnaJ-domain-containing protein</i>	7116	1	(1)
A0A1X0SDV8	<i>ATPase GET3</i>	6497	2	(1)
A0A0C7C734	<i>Uncharacterized protein</i>	4589	1	(1)
A0A0C7BEY1	<i>Uncharacterized protein</i>	4320	1	(1)
A0A0C7C0M8	<i>Uncharacterized protein</i>	9619	2	(1)
A0A0C7BDX0	<i>Uncharacterized protein</i>	11698	2	(1)
A0A1X0RQT6	<i>Cytochrome P450</i>	9498	2	(1)

Legenda: proteínas expressas: ausência de Cu^{2+} (0), presença de Cu^{2+} (1)

O detalhamento das reações a nível molecular realizado através GO (Uniprot) mostrou a identificação de proteínas referentes à 8 funções moleculares principais: ligação, reguladora enzimática, peroxidases, catalítica, transportadora, reguladora de função molecular e atividade estrutural constitutiva do ribossomo.

Ao comparar as funções moleculares das diferentes proteínas expressas nos cultivos do fungo *R.micr sporus* VC na ausência (Figura 18) e presença de íons cobre (Figura 19), foi observada em condições de estresse uma redução de 50% nas proteínas com atividade reguladora do transporte e peroxidases, enquanto observou-se um aumento da expressão de proteínas de ligação (17,6%). Por outro lado, proteínas responsáveis pela estrutura do ribossomo e regulação da função estrutural da molécula não foram identificadas. No cultivo contendo íons metálicos nota-se a expressão de proteínas com função estrutural molecular e proteínas responsáveis pela regulação enzimática.

Nos cultivos na ausência de íons metálicos, foi possível observar a expressão de enzimas que atuam na integridade estrutural do ribossomo no citoplasma e proteínas responsáveis pela repação do DNA celular como, *60S ribosomal protein L20*, *Putative 40S ribosomal protein S6*, *Putative DNA polymerase*, *DUF1744-domain-containing protein*. Na presença de cobre foi observada a expressão de proteínas de regulação da atividade enzimática como, *ERG2 and sigma1 receptor-like protein*, *Protein phosphatase PP2A regulatory subunit B* e *Proliferating cell nuclear antigen*, estas enzimas atuam como cofatores de íons metálicos que se unem a proteína receptoras de elétrons no processo de catalise substrato proteico.

Figura 18: Função Molecular do fungo *R.microsporus* VC na ausência de cobre (Uniprot, <http://www.uniprot.org>).

Figura 19: Função Molecular do fungo *R.microsporus* VC em presença de cobre (50mg/L Cu^{2+}) (Uniprot, <http://www.uniprot.org>).

Analisando as diferentes proteínas expressas no cultivo contendo íons cobre (389 proteínas), observa-se uma pequena redução de enzimas relacionadas à atividade catalítica (3,7%), dentre as quais foram identificadas proteínas como *cytochrome P450*, *malic enzyme*, *acyl-CoA desaturase*, *oxidoreductase activity* atuando em presença de NAD(P)H.

Dentre as proteínas de ligação expressas no cultivo de estresse induzido pelo cobre, podemos destacar, *calreticulin*, *cell division/GTP binding protein*, *tyrosine--tRNA ligase*, *arginyl-tRNA synthetase* e *ATP-dependent metalloproteinase Hfl*, proteínas que atuam seletivamente no citoplasma celular e não covalentemente com íons, átomos.

A expressão de proteínas com atividade de transferência/transportadora, relacionadas ao movimento de substâncias, íons ou moléculas, dentro e fora da célula ou entre grupos celulares, foi reduzida em presença do metal. Proteínas com atividade transportadoras como *V-type proton ATPase subunit G*, *cytochrome b-c1 complex subunit rieske*, *mitochondrial* também foram diferencialmente expressas na presença do cobre.

Proteínas de estresse oxidativo, como *HSP*, *dnaJ-domain-containing protein* foram identificadas no cultivo contendo o íon metálico, entretando, o fungo adaptado ao ambiente de mineração, apresenta proteínas de choque térmico em seu metabolismo basal. Proteínas relacionadas ao estresse oxidativo, como as HSPs foram encontradas em maior proporção em presença do metal. Na Tabela 7 são apresentadas algumas proteínas expressas em presença de cobre.

Tabela 7: Proteínas identificadas por espectrometria de massas do fungo *R.microsporus* VC em presença de íons Cu^{2+} (Uniprot, <http://www.uniprot.org>).

Nome	Nº de acesso	Massa (Da)	Função
Resposta ao estímulo			
<i>Catalase (EC 1.11.1.6)</i>	A0A0A1N1T5	54551	Libera o oxigênio produzido pelo estresse oxidativo (cofactor metálico usa o Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} ou Zn^{2+}).
<i>DnaJ-domain-containing protein</i>	A0A1X0S643	44080	Atua na interação seletiva e não covalente com uma proteína de choque térmico.
<i>Heat shock protein (Hsp90)</i>	A0A1X0RL43	85167	Propicia a manutenção de peptídeos sobre condições de estresse.
Processo celular			
<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M (eIF3m)</i>	A0A0C7BKN5	44975	Regulação da iniciação da tradução.
<i>Putative Actin-like protein 2</i>	A0A0A1P7B5	39001	Arp2 / 3 complexo de proteína.
<i>Putative F-actin-capping protein subunit beta isoforms 1 and 2</i>	A0A0A1NNW7	29530	Interação seletiva e não covalente com formas monoméricas ou multiméricas de actina, incluindo filamentos de actina.
<i>Putative Histone H1/5</i>	A0A0C7B1S0	23636	Atua nas funções moleculares pelas quais um produto genético interage seletivamente e não covalentemente com o DNA.
<i>Tubulin-specific chaperone A</i>	A0A0A1PL34	12071	Atua na conclusão do dobramento de alfa e beta-tubulina; ocorre após a dobragem parcial mediada por chaperonina; mediada por um complexo de cofatores dobráveis.

<i>Putative Ribonucleoprotein-associated protein (Ribonucleo protein-associated protein)</i>	A0A0A1N4D2	13667	Interação seletiva e não covalente com uma molécula de RNA ou uma sua porção.
<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J</i>	A0A0A1MPZ9	27207	Funções no início da tradução mediada por ribossomo de RNAm em um polipéptido.
<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A</i>	A0A1X0RWZ1	113260	Funções no início da tradução mediada por ribossomo de RNAm em um polipéptido.
<i>Putative F-actin-capping protein subunit beta isoforms 1 and 2</i>	A0A0A1NNW7	29530	Atua na ligação de um complexo de proteína ou proteína à extremidade farpada (ou mais) de um filamento de actina, evitando assim a adição, troca ou remoção de outras subunidades de actina.
<i>Putative Transketolase</i>	A0A0C7CL20	73799	Mutação; Atua nas reações e caminhos químicos, incluindo anabolismo e catabolismo, pelos quais os organismos vivos transformam substâncias químicas. Reparo do DNA, síntese e degradação de proteínas.
<i>Uncharacterized protein</i>	A0A0A1P250	33263	Mutação.
<i>NAP-domain-containing protein</i>	A0A1X0RTZ3	44918	Atua no arranjo e a união de um nucleossomo.
<i>T-complex protein 1 subunit delta</i>	A0A1X0RKK8	57419	Atua na montagem covalente e não covalente de polipéptidos.
<i>3-isopropylmalate dehydratase</i>	A0A1X0RUE0	81951	Atua na biossíntese de aminoácidos.

Reparo do DNA

<i>Uncharacterized protein</i>	A0A0C7C0M8	49737	Atua na interação seletiva e não covalente com o DNA danificado.
--------------------------------	------------	-------	--

Legenda: As 389 proteínas expressas pelo fungo *R.microporus* VC em presença de cobre encontram-se na Tabela 4 do Anexo II .

Dentre as proteínas expressas pelo fungo *R.microsporus* VC, tanto em presença quanto na ausência de cobre, foram encontrados 6 processos biológicos do fungo (Figura 20). Nos cultivos do fungo *R.microsporus* VC em presença do íon Cu^{2+} , percebe-se aumento significativo na presença de proteínas relacionadas aos processos celular, metabólicos, localização celular e regulação biológica.

Figura 20: Processos Biológicos expressos no fungo *R.microsporus* VC: (■) ausência de cobre e (■) presença de Cu^{2+} (Uniprot, <http://www.uniprot.org>).

Dentre as proteínas relacionadas à síntese protéica, destacam-se as ribossomais e os fatores de alongação. Enzimas relacionadas à via glicolítica foram afetadas pela presença de íons cobre, reduzindo assim o fornecimento de ATP e intermediários.

Em ambos os cultivos foram observadas proteínas correspondentes ao metabolismo dos aminoácidos, do nitrogênio, dos carboidratos e compostos de carbono; metabolismo de lipídeos, biossíntese de vitaminas e cofatores enzimáticos, no entanto, proteínas como por exemplo *glycoside hydrolase*, *phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase*, *methionine aminopeptidase 2*, *6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase* foram identificadas somente em presença do íons cobre.

No cultivo do fungo *R.microsporus* VC em presença de íons Cu^{2+} , além da superexpressão de proteínas envolvidas nos metabolismo celular, não houve aumento significativo de proteínas referentes à resposta ao estímulo. No entanto, houve a expressão de *catalase*, *dnaJ-domain-containing protein*, *heat shock protein* (Hsp90), sugerindo alteração dos processos metabólicos, devido à mudança de estado ou atividade celular, bem como modificação do organismo.

Enzimas envolvidas na glicólise e gliconeogênese, como *pyruvate kinase* e *enolase*, bem como a *glutamine synthetase* e *adenosylhomocysteinase*, proteínas associadas à assimilação de cobre na célula, foram identificadas em ambos os cultivos. Dentre as metaloproteínas diferencialmente expressas em ambos os cultivos do fungo *R.microsporus* VC (Tabela 8), observa-se que sob o estresse induzido pelo cobre foram expressas proteínas não detectadas na ausência do metal, assim como uma maior expressão de metaloproteases, como por exemplo *Leukotriene A(4) hydrolase*, *Putative AFG3 family Protein* e *ATP-dependent metallopeptidase Hfl*.

Tabela 8: Metaloproteínas diferencialmente expressas *R.microsporus* VC na presença e ausência de íons Cu^{2+} .

Nºde Acesso	Proteínas	-10lgP	Peptídeos	Classificação	Cultura
A0A1X0S1W9	<i>Uncharacterized protein</i>	11862	1	Metaloprotease	(0)
A0A0A1PKX7	<i>Uncharacterized protein</i>	10416	1	Metaloprotease	(0)
A0A0C7BQQ3	<i>Uncharacterized protein</i>	16828	4	Metaloprotease	(0)
A0A0A1MZB9	<i>Uncharacterized protein</i>	10839	3	Metaloprotease	(0)
A0A0C7AWK5	<i>Uncharacterized protein</i>	12007	1	Metaloprotease	(0)
A0A1X0S9G4	<i>Peptidase M22, glycoprotease</i>	5935	1	Metaloprotease	(0)
A0A0A1N8S1	<i>GrpE protein homolog</i>	12687	1	Chaperona	(0)
A0A1X0RX01	<i>ATP-dependent metallopeptidase Hfl</i>	7174	1	Metaloprotease	(1)
A0A0A1NPA5	<i>Putative AFG3 family Protein</i>	8085	1	Metaloprotease	(1)
A0A0C7BAC5	<i>Putative Cell division protease ftsH</i>	8085	1	Metaloprotease	(1)
A0A0C7B9Z9	<i>Putative YALI0A10615p</i>	8085	1	Metaloprotease	(1)
A0A0C7C4D0	<i>Leukotriene A(4) hydrolase</i>	4909	1	Metaloprotease	(1)
A0A0A1NVS8	<i>Methionine aminopeptidase 2 (MAP 2) (MetAP 2)</i>	3734	1	Metaloprotease	(1)
A0A0A1P552	<i>Uncharacterized protein</i>	4340	1	Chaperona	(1)

Legenda: proteínas expressas: ausência de Cu^{2+} (0), presença de Cu^{2+} (1)

6 DISCUSSÃO

Os fungos são microrganismos com amplo potencial na absorção de íons metálicos em diferentes concentrações e tem sido vastamente estudado em processos de biorremediação de áreas contaminadas com metais. O cobre, é um metal de transição essencial para uma ampla gama de enzimas, mas em excesso pode inibir o crescimento celular, metabolismo e as expressão protéica (KRUMOVA et al., 2016). As condições de estresse oferecidas pelo ambiente de mineração de cobre, permitem o surgimento de microrganismos resistentes ou adaptados molecularmente para manter a homeostase, suprimindo o estresse oxidativo intracelular (LUNA et al 2015).

Assim, foi possível observar que, nas análises da fermentação semi-sólida, os fungos isolados do ambiente de mineração apresentaram inibição da fase germinativa quando exposto a concentração superiores a 400 mg/L e 200 mg/L para os fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC de Cu^{2+} , respectivamente. Segundo a literatura, o cobre é um elemento essencial para o metabolismo do fungo, entretanto, quando presente em altas concentrações inibe a atividade germinativa (ANAHID et al., 2011).

A comparação do crescimento dos fungos cultivados em meio líquido, na ausência e presença de Cu^{2+} , mostrou que em condições de estresse gerados pela adição de cobre, o fungo *A.niger* VC apresentou maior resistência. *A.niger* VC não exibiu redução na fase logarítmica do crescimento durante as 140 horas de cultura na presença de cobre, enquanto o fungo *R.microsporus* VC apresentou uma redução de 65,14% na velocidade de crescimento, e o início da fase estacionária foi observado após 50 horas de cultivo, em presença do agente oxidante.

Nos cultivos dos fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC na ausência e na presença de íons metálicos, foi possível observar que a alteração do crescimento celular pode estar relacionada à influência direta dos íons metálicos sobre os processos fisiológicos dos microrganismos, tais como bloqueios de grupos funcionais biologicamente importantes ou desnaturação de enzimas. Como o crescimento reflete o metabolismo celular, ele tem sido usado como um indicador chave na tolerância de metais tóxicos para microrganismos (URUNAKUMARA e XUECHENG, 2008).

A adsorção de íons metálicos por fungos pode ser afetada por variáveis como condições físico-químicas resultantes de alterações no pH, ligantes disponíveis e outros metabólitos presentes no meio (KAPOOR et al., 1999; DHANKHAR, 2011; GADD, 2014). O pH é um dos fatores mais importantes no processo de remoção de metais utilizando biomassas microbianas, visto que influencia na solubilidade dos metais (PINO, 2005; GADD, 2014).

Considerando os resultados de adsorção de cobre apresentados pelos fungos foi possível determinar que a maior eficiência, ou seja, máxima absorção de cobre para o *A.niger* VC é aproximadamente 72 horas de cultivo (62%) e aproximadamente 48 horas para o *R.microsporus* VC(45%).

A baixa adsorção do metal registrada na coleta realizada após 90 horas de incubação para *A.niger* VC e 60 horas para *R. microsporus* VC, sugere que a redução do pH alterou o metabolismo de absorção do fungo, sendo registrados os pH's de 2,31 para *A.niger* VC e 2,91 para de *R.microsporus* VC ao final dos cultivos contendo íons metálicos. Isto sugere que, em pH ácido, a carga global da superfície da parede celular do fungo torna-se positiva, reduzindo assim a capacidade de adsorção (SARI e TUZEN, 2009; DHANKHAR, 2011; GADD, 2014). Portanto, a partir dos resultados obtidos no estudo de absorção de Cu^{2+} , foram determinados os tempos de cultivos de 72 horas para o fungo *A.niger* VC e 48 horas para a espécie *R.microsporus* VC, como sendo os pontos de maior adsorção escolhidos para o estudo proteômico.

Neste sentido, a caracterização proteômica dos fungos isolados do ambiente de mina *A.niger* VC e *R.microsporus* VC, foi utilizada como uma ferramenta que agrega informações sobre o perfil metabólico do fungo e possibilita a identificação de biomarcadores quando o microrganismo é submetido ao estresse pela exposição ao cobre. Por ser um metal essencial para uma ampla gama de enzimas, a ligação metal- proteína é relevante para modificações pós-traducionais, ou seja, o íon metálico atua na estabilidade e alterações das funções moleculares e processos biológicos indispensáveis para a vida celular (FENG et al., 2017).

Sabe-se, que em excesso o cobre pode ser tóxico, por desencadear a geração de espécies reativas de oxigênio, que causam danos a lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (HODGKINSON e PETRIS, 2012; FENG et al., 2017). Os fungos possuem mecanismos de absorção de metais além de um amplo sistema regulatório e biossintético para a

incorporação dos íons metálicos a proteínas (HAGEDOORN, 2015). O excesso de cobre leva a distúrbios metabólicos, podendo ocasionar graves danos ao crescimento e desenvolvimento das células, influenciando no proteoma fúngico (BANCI et al., 2011). As proteínas possuem cofatores metálicos que desempenham um importante papel na catálise enzimática, transporte e regulação (KRESTSINGER, 2013), proteínas cobre dependentes, como citocromo c oxidase, exercem um papel crítico na sobrevivência celular (HAMZA e GITLIN 2002).

Serrano, (SERRANO et al., 2004) observou que a absorção de cobre e ferro foram fatores limitantes no crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Em relação à categoria de funções metabólicas. Labbé, (LABBÉ et al., 1999) observou que a expressão de genes reguladores de metal concentra-se em um conjunto de fatores de transcrição que se ligam ao DNA de *Sccharomyces pombe*. Banci, (BANCI et al., 2011) observaram que após a exposição a 1 mM de cobre, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresentou comprometimento das funções mitocondriais e ativação de resposta ao estresse oxidativo. Curiosamente nesta levedura ocorreu a expressão de proteínas de ativação das vias de sobrevivência, ou seja, proteínas envolvidas na transdução de sinal que levaram o crescimento e a sobrevivência celular.

Neste contexto, foi realizado o estudo proteômico dos fungos *A.niger* VC e *R. microsporus* VC na ausência e na presença de Cu^{2+} em cultivos de 72 e 48 horas, respectivamente. As análises proteômicas dos fungos estudados foram realizadas através da técnica NanoLC-ESI-Q-TOF. Para o fungo *A.niger* VC, foram identificadas 1476 e 1352 proteínas, respectivamente na ausência e na presença de Cu^{2+} , respectivamente enquanto que para o fungo *R. microsporus* VC foram identificadas 1070 e 1232 proteínas na ausência e em presença de Cu^{2+} , respectivamente.

Os resultados obtidos nas análises proteômicas do fungo sob a influência do cobre (50 mg/L) mostraram maior resistência e redução da expressão protéica para o fungo *A.niger* VC, sendo diferencialmente expressas 132 proteínas. Enquanto o fungo *R.microsporus* VC apresentou baixa resistência e maior expressão protéica em presença do metal, sendo 389 proteínas diferencialmente expressas.

As proteínas diferencialmente expressas no fungo *A.niger* VC foram classificadas quanto a suas funções moleculares e agrupadas em 9 classes de proteínas. Essas categorias funcionais representam os principais processos biológicos dos eucariotos, incluindo catabolismo do formaldeído, esporulação assexuada com formação de um esporo celular, localização, regulação biológica, organização de componentes celulares, resposta ao estímulo, processos celular e processos metabólicos, com proteínas responsáveis pelo dobramento, respiração celular, metabolismo de aminoácidos (piruvato, etanol, transporte de íons metálicos e homeostase).

A análise proteômica do *A.niger* VC em resposta ao cultivo na presença de íons cobre, revelou uma subexpressão de proteínas responsáveis pela transcrição do DNA. Em *Sccharomyces pombe* os genes regulados por metal foram encontrados em conjunto com os fatores de transcrição de DNA, o mesmo ocorreu para o *Schizosaccharomyces pombe* quando submetido ao estresse por metal (LABBÉ et al., 1999; PELLETIER et al., 2002), ou seja, a metaloregulação desses fatores de transcrição de ligação com o DNA fúngico envolvem alterações protéicas em decorrência da exposição ao metal.

A identificação das proteínas de marcação (*protein tag*) *Aspergillus niger contig*, *An08g02950*, no cultivo na ausência de Cu^{2+} , descata-se por atuar no metabolismo a fim de direcionar alterações do processo celular, modificação, transporte ou degradação protéica (Instituto Europeu de Bioinformática, <https://www.ebi.ac.uk/genomes/AM270986.html>), sugerindo que o cobre como agente indutor de estresse inibe a expressão destas espécies proteicas.

A proteína *S-formylglutathione hydrolase* (FGH), correspondente ao processo de fosforilação em resposta às interações químicas ou mudanças ambientais foi observada na ausência do metal. A FSH se destaca como uma enzima chave na biossíntese da glutathione (GSH), que é a principal molécula antioxidante endógena gerada pelas células ($\text{S-formylglutathione} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{glutathione} + \text{formiato}$). As enzimas relacionadas ao GSH dependem da energia metabólica, requerendo energia adicional para a síntese, ou regulando negativamente a reação catalisada, aclimatando as células ao estresse de Cu^{2+} , reduzindo a expressão da enzima com maior consumo de energia (XIA et al., 2011). Quando avaliada a sensibilidade do fungo *A.niger* VC aos íons de cobre, observamos uma tendência de inibição sinérgica do crescimento, que pode ser caracterizada pela redução da glutathione (GSH),

sugerindo que o cobre aumenta o mecanismo de defesa do hospedeiro e consequentemente, o fator NADPH oxidase.

A *Cobalamin-independent methionine synthase* (MetE) não foi observada na presença de cobre, sugerindo que a agregação de cobre pode estar relacionada ao estresse oxidativo. Embora este fungo tenha sido isolado do ambiente da mina, a exposição ao cobre inibe a produção de MetE dentro da célula. Estudos com *E.coli* descrevem uma subexpressão de MetE após a exposição ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂), induzindo uma resposta de choque térmico, e também foi observada uma redução na capacidade de transcrição da célula em resposta ao estresse (HONDORP e MATTHEWS, 2004).

A glicólise é uma importante fonte de energia para a conversão de proteínas chaves no metabolismo do piruvato, enquanto produzem ATP e NADH, a partir daí as células utilizam duas estratégias de produção de energia, fermentação e respiração, embora na presença e ausência do agente oxidante, regenera-se NAD⁺ (ASKEW et al., 2009). No entanto, o tratamento de *A.niger* VC com cobre, mostrou uma redução na expressão das proteínas da via glicolítica.

O dados proteômicos observados neste estudo mostram que as células do fungo *A.niger* VC em presença de Cu²⁺ (50 mg/L) sofrem redução das proteínas envolvidas no processo da respiração mitocondrial, sendo observada uma sub expressão de proteínas pertencentes ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e de cadeia respiratória. A expressão da proteína *aldehyde dehydrogenase* (EC 1.2.1.3) em presença de cobre sugere que a função respiratória mitocondrial das células, após a exposição do agente oxidante, foi reduzida. Proteína da família das *aldehyde dehydrogenase* são responsáveis pelo controle da respiração celular durante a fermentação e na biossíntese dos transportadores de elétrons e acetato, durante o crescimento anaeróbico (TESSIER et al., 1998; SAINT-PRIX et al., 2004; BANCI et al., 2011).

O *A.niger* VC em ausência de cobre apresentou maior concentração de enzimas relacionadas com o metabolismo de aminoácidos, devido à redução na atividade mitocondrial, sendo a grande maioria correlacionada com degradação de aminoácidos. Proteínas intermediárias ao ciclo do TCA, obtidas através da degradação dos aminoácidos, como *malate dehydrogenase* e *acetyl-CoA-acetyltransferase* foram identificadas somente na ausência do metal. A incapacidade de identificar proteínas do ciclo do TCA na presença de cobre,

provavelmente resultou da sua baixa abundância, ou devido à sub expressão destas enzimas na membrana celular.

A.niger VC em presença de cobre, apresentou indícios da inibição do crescimento celular, representado pela presença do agente redutor glutathiona (GSH). Isto sugere um aumento no mecanismo de defesa e consequentemente aumento no fator de transcrição relacionado às proteínas que ligam no cobre. Enzimas relacionadas à GSH podem depender do metabolismo energético, necessitando de altos níveis energéticos para a síntese ou para reações catalisadas, que devem ser reguladas negativamente, pois quando as células enfrentam altas concentrações de Cu^{2+} , elas necessitam de maior energia para se aclimatar ao estresse provocado pelo Cu^{2+} , e, portanto, enzimas com maior consumo de energia serão reduzidas (XIA et al., 2011).

O metabolismo celular tem desenvolvido muitas estratégias para lidar com mudanças adversas no ambiente. Entre essas, as proteínas de resposta ao estresse por choque térmico (HSP) é a mais conservada (WELCH, 1992; FEHRENBACH e NIESS, 1999). Na geração de mecanismos de defesa, através do complexo NADPH/oxidase, *cytochrome c oxidase*, *superóxide dismutase* (SODs), *laccases*, transportadoras de ferro redutor e toxinas microbianas, estas proteínas atuam como cofator, essencial para absorção do metal (DING et al., 2014; DJOKO et al., 2015). A indução destas proteínas pode inicialmente ser interpretada como um sinal de estresse fisiológico. Está estabelecido que a indução é um fator fundamental nos processos de reparo, segundo cada tipo de dano, e na prevenção contra a agregação e coagulação de proteínas não nativas (SANTORO, 2000; RICHTER et al., 2010).

Proteínas relacionadas ao complexo proteico situado nas membranas mitocondriais denominado complexo TOM foram expressas em ambos os cultivos, como *cytochrome c oxidase subunit 1*, *cytochrome c oxidase subunit 2* e *cytochrome c oxidase subunit 6A*, *mitochondrial (cytochrome c oxidase polypeptide VIa)*. Este complexo atua no DNA através da membrana mitocondrial para o uso da fosforilação, com isto uma grande maioria das proteínas destinadas as mitocôndrias são codificadas no núcleo e sintetizadas no citoplasma, sendo marcadas por uma sequência de proteínas N-terminal (MAIO et al., 2017). Estudos com *S.cerevisiae* tratados com cobre mostraram que proteínas do citosol do complexo TOM da membrana externa mitocondrial apresentaram uma expressão reduzida nas suas subunidades

(COBINE et al., 2006). No entanto, em presença de cobre, observou-se uma sub expressão destas proteínas registrando-se só a presença de *cytochrome c1*.

A.niger VC mostrou indução de proteínas da família HSPs 60 em presença de cobre. As HSP 60 têm sido associadas diretamente à resposta ao estresse oxidativo, devido à um conjunto de dois anéis que promovem o dobramento das proteínas em seu estado nativo, importando proteínas da matriz mitocondrial ou que se concentram no espaço intermembranar (RAGGAM et al., 2010; IRAZUSTA et al, 2012). Proteínas como *14-3-3 protein*, *superóxide dismutase* (SOD) e *catalases* (FEDER e HOFMANN, 1999; ROBERTS et al., 2002; LI et al., 2009) que apresentam tolerância ao estresse abiótico, foram identificadas na presença do agente oxidante.

Em presença de cobre foi observada a indução de SOD (Cu-Zn), proteínas envolvidas na resposta ao estresse, predominantemente localizadas no citoplasma onde atuam como antioxidante e chaperona frente aos efeitos dielétricos e oxidativos (JAMIESON, 1998; IRAZUSTA et al, 2012; FENG et al., 2017). Assim, a atividade SOD (Cu-Zn) foi indicada como diretamente responsável pela produção de células mutantes do fungo, adaptadas ao estresse oxidativo (IRAZUSTA et al., 2010). Nossos dados sugerem que as proteínas acima citadas estão associadas à tolerância ao cobre. Contudo, diferentes HSPs foram identificadas na ausência do metal, sugerindo adaptação do *A.niger* VC ao ambiente de mina (choque térmico, privação de glicose e diferentes metais tóxicos, etc).

As metaloproteínas, podem manifestar maior afinidade por complexos de cobre, zinco, cobalto e níquel, complexos ferrosos, manganês, e menor afinidade por complexos de cálcio e magnésio (WALDRON et al., 2009). Estas proteínas atuam na fisiologia celular como enzimas catalíticas, de transporte, de armazenamento e transdutora de sinal. Segundo seus grupos protéticos elas podem ser classificadas como metalopeptidases, metalocarboxilases, metaloprotease, além de metalochaperonas: chaperonas e superóxido desmutase. Neste estudo as metaloproteínas foram diferencialmente expressas na ausência e na presença de Cu^{2+} . No entanto, foram identificadas em maior proporção na ausência do agente oxidante.

No fungo *A.niger* VC, foi observada redução na expressão de metaloproteínas quando submetido ao estresse com cobre, sugerindo que a metalização através das enzimas

expressas *vacuolar carboxypeptidase Cps1* e *superoxide dismutase*, ocorre dentro do espaço intermembranar da mitocôndria. Cobine, (COBINE et al., 2006) estudou o citocromo c oxidase como chaperona de cobre para superóxido desmutase no citoplasma da levedura, de modo que a metalização de cobre ocorre dentro da organela.

Contudo não estão claras quais metaloenzimas capturam o metal, ainda que o cobre esteja presente na análise de proteínas transportadoras, que atuam na aquisição, mobilização e sequestro do cobre (WALDRON et al., 2009; SILAR et al., 2011; FENG et al., 2017). No entanto, considerando que o cobre é relevante para modificações pós-traducionais da proteínas, a subexpressão de metaloproteínas pode refletir na resistência do *A.niger* VC frente ao metal.

As proteínas diferencialmente codificadas no fungo *R.microsporus* VC foram classificadas quanto às suas funções moleculares e agrupados em 6 classes que representam os principais processos biológicos dos eucariotos. Estas funções atuam na síntese protéica, localização, regulação biológica, organização de componentes celulares, resposta ao estímulo, processos celulares e processos metabólicos, incluindo proteínas responsáveis pelo enovelamento, respiração celular e metabolismo de aminoácidos (piruvato, etanol, transporte de íons metálicos e homeostase).

O fungo *R.microsporus* VC apresentou grande alteração no crescimento celular no cultivo contendo cobre. A super expressão proteica observada após exposição aos íons cobre ocorre possivelmente devido à ativação da resposta ao estresse oxidativo que leva à sobrevivência e crescimento celular.

Em presença do metal, foi observada a expressão de proteínas responsáveis pela mudanças na atividade das vias do ciclo do TCA, obtidas através da degradação dos aminoácidos, como *mitochondrial pyruvate carrier*, *putative acetyl-CoA hydrolase/transferase*. Os dados protéicos gerados nos cultivos do fungo *R.microsporus* VC mostram que as células tratadas com cobre, sofrem redução em todos os processos envolvidos na respiração mitocondrial. Uma das principais funções da mitocôndria é a geração de ATP através dos complexos respiratórios que transportam os elétrons obtidos a partir da oxidação de NADH e FADH até o citocromo para a redução do oxigênio (RICHTER et al., 2010).

Proteínas como *cytochrome P450*, *malic enzyme*, *acyl-CoA desaturase*, *oxidoreductase activity* atuando em presença de NAD(P)H foram codificadas em presença do agente oxidante. Responsáveis por reações de oxido-redução (redox), estas proteínas se ligam ao substrato atuando na transferência de elétrons, em que o oxigênio molecular é reduzido ou incorporado como um doador de elétrons, ocorrendo interação seletiva e não covalente com os íons presentes no meio, alterando assim o metabolismo da célula (HAGEDOORN, 2015).

No fungo *R.microsporus* VC o complexo piruvato desidrogenase foi suprimido em presença de cobre. O piruvato produzido através da via glicolítica e pela via das pentoses fosfato no metabolismo celular é oxidado, seguido do processo de descarboxilação à acetil-CoA pelo complexo piruvato desidrogenase na respiração aeróbica (VELLUCCI *et al*, 2007), sugerindo que a disponibilidade de acetil-CoA gerado pelo piruvato pode ser importante para a sobrevivência de *R.microsporus* VC em condições de estresse.

FMN-linked oxidoreductase (FMN) foi expressa sob estresse com cobre. Enzima responsável pela interação seletiva atuando no estado oxidativo do átomo envolvendo intermediários na biossíntese de aminoácidos aromáticos entre outros compostos, precursores de enzimas elétron doadoras. Além disso, a FMN atua como proteína responsável pela alteração da parede celular, e na manutenção estrutural da célula, protegendo a lise osmótica do metabolismo fúngico (THE UNI CONSORTIUM^{1,2,3,4}, 2017).

De acordo com a atividade mitocondrial do fungo *R.microsporus* VC, em presença do metal, foi observada a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo do aminoácido e à síntese de proteínas. Estas são *phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase*, *methionine aminopeptidase 2*, *6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase*, *putative aspartate-semialdehyde dehydrogenase*. A expressão de proteínas do citosol pelo complexo TOM, não foram prejudicadas, como é sugerido pela presença das subunidades *cytochrome b5* e *cytochrome P450* expressas em presença de cobre. Também verificou-se a expressão da subunidade do complexo mitocondrial *cytochrome b-c1 rieske*, que atua junto ao cofator Fe-S na mitocôndria bem como no citoplasma, participando da transferência de elétrons do ubiquinol para o citocromo durante o processo de fosforilação oxidativa (MAIO *et al.*, 2017).

A presença do agente oxidante faz com que o fungo seja capaz de realizar modificações no metabolismo celular, a fim de sobreviver a mudanças ambientais. Dentre as

respostas metabólicas ao estresse oxidativo podemos destacar a expressão das HSPs, que inicialmente pode ser caracterizada como resposta fisiológica ao estresse causado pelo metal (RICHTER et al., 2010). Contudo, sabe-se que sob condições de estresse de cobre, ocorre redução na expressão de proteínas relacionadas à mitocôndria, enquanto as proteínas de choque térmico e catalase aumentam significativamente (FENG, 2017). Esta classe de proteínas, além de atuar em condições normais, podem ser expressas ou sobreexpressas em condições de estresse. Logo, proteínas de HSPs identificadas no cultivo em presença do metal sugerem modificações na estrutura da parede celular do fungo. As HSPs expressas podem ser responsáveis pela resistência à toxicidade ou absorção do metal.

Em resposta à exposição ao cobre, o fungo *R.microsporus* VC, apresentou proteínas de choque térmico e defesa ao estresse oxidativo, como por exemplo HSPs (HSP 70, HSP 78, HSP 90) e *ATPase GET3*, foi possível observar um aumento na expressão de HSPs em presença de cobre. As HPS 70 e HSP 90 são subgrupos da família das HSPs mais abundantes, pois apresentam maior afinidade à citoproteção por desenvolverem uma rede regulatória complexa que controla a expressão gênica em resposta ao estresse ambiental (GOLLI-BENNOUR e BACHA, 2011). Portanto, a expressão de HSPs no *R.microsporus* VC pode ser sugerida como uma resposta de adaptação celular ao estresse causada pela exposição ao cobre. As modificações no metabolismo celular e expressão de metaloproteínas, ocorrem através da oxidação catalisada pelo metal, pois através desse mecanismo o íon divalente é ligado à uma cadeia polipeptídica, gerando espécies reativas de oxigênio capazes de danificar as cadeias de aminoácidos vizinhas (IRAZUSTA et al., 2012).

Na espécie *R.microsporus* VC em ambos os cultivos, em ausência e presença de íons Cu^{2+} , foi caracterizado um amplo repertório de proteínas relacionadas a resposta do metabolismo fungico as condições tóxicas nas áreas de mineração. Através dos resultados obtidos no estudo proteômico, podemos ressaltar as metaloproteínas, proteínas associadas a íons metálicos como cofator. Como descrito no item 5.3.1 as metaloproteínas podem manifestar maior afinidade por complexos metálicos, pois atuam estruturalmente na célula em diferentes formas enzimáticas funcionais, por exemplo, armazenamento, catálise e transporte de acordo com seu grupo protêico.

No cultivo do fungo *R.microsporus* VC em presença de cobre, foi observada uma maior expressão de metaloproteínas como *ATP-dependent metalloproteinase Hfl*, *cytochrome*

P450 e methionine aminopeptidase, putative cell division protease ftsH. As alterações nas vias metabólicas sugerem a presença do metal, promove mudança de estado ou atividade celular, bem como modificação dos organismos (secreção, expressão gênica, etc) que resultam em distúrbios da homeostase celular, geralmente relacionados à temperatura, umidade e estresse oxidativo (WALDRON et al., 2009).

Entre as metaloproteínas identificadas a *ATPase GET*, do fenótipo *Get3*, destaca-se por sua sensibilidade ao cobre atuando no metabolismo como chaperona controlada por reações redox (VOTH et al., 2014). A função de chaperona independente do ATP é particularmente crucial nestas condições de estresse, pois sua exposição a espécies reativas de oxigênio provocam grave e rápida redução nos níveis celulares de ATP.

Três proteína hipotéticas foram classificadas como metaloprotease, como por exemplo, *putative cell division protease ftsH*, que atua como metaloprotease de zinco dependente de ATP, tanto para proteínas citoplasmáticas quanto para proteínas de membranas. Estudos realizados com *thermotoga maritima*, descrevem a proteína *FtsH*, como um membro da subclasse de metaloproteases de zinco (Zn^{2+}), que tem como característica estrutural uma região C-terminal no domínio da protease que consiste de três hélices (NARBERHAUS et al., 2009).

Chiu, (CHIU et al., 2014) estudou a regulação do oxigênio reativo (redox) realizada a partir da clivagem da metionina através da catálise da metaloproteínas *methionene aminopeptidase* (MetAP1 e MetATP2) contendo íons cobalto (Co^{2+}). Esta metaloproteína se destaca por ser essencial no mecanismo de proliferação e viabilidade do fungo. As enzimas segregadas, tais como serina proteases e metaloproteases, são controladas por inibidores de protease no meio extracelular, enquanto que a atividade da protease celular é frequentemente controlada pelo sequestro das enzimas em compartimentos discretos, como organelas ou membranas. Isto sugere que as metaloproteínas *methionine aminopeptidase e putative cell division protease ftsH*, interagem no metabolismo do fungo na presença do íons cobre.

A análise proteômica do fungo *R.microsporus* VC submetido ao estresse induzido por cobre, possibilitou mostrar a diferenciação do perfil protéico, mesmo o microrganismo já estando adaptado ao ambiente de mineração, contendo altos teores de metal tóxico. Uma maior expressão protéica em presença do metal foi observada, quando comparado ao cultivo

em ausência do agente oxidante, sugerindo que proteínas de choque térmico e metaloproteínas identificadas podem estar relacionadas com a exposição e absorção de cobre.

Os resultados desse estudo para os fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC mostraram que mesmo os fungos provenientes do ambiente de mina, adaptados a uma grande diversidade de íons metálicos, quando cultivados em ausência e presença de cobre, apresentam diferentes comportamentos no crescimento celular, absorção e expressão protéica.

7 CONCLUSÕES

Os fungos *A. niger* VC e *R.microsporus* VC apresentam características úteis no processo de remoção de metais de ambientes contaminados, devido à sua maior absorção e tolerância ao cobre. Estas características foram adquiridas durante a adaptação das espécies fúngicas ao ambiente de mineração de onde foram isolados.

No processo de fermentação semi-sólida, os fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC apresentaram mínima concentração inibitória (MIC) em 400 mg/L e 200 mg/L de Cu^{2+} , respectivamente.

No processo de fermentação em meio líquido, o fungo *A.niger* VC não exibiu decaimento da fase exponencial até o final da cultura (140 h) indicando resistência ao metal. Por outro lado o fungo *R.microsporus* VC apresentou uma redução de 65,14 % no crescimento celular, observando-se o início da fase estacionária após cerca de 50 horas de exposição ao cobre.

A presença do fator de alongação de proteínas e os sistemas de transcrição ativos, indicam que os fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC, isolados do ambiente de mina de cobre, continuam crescendo e se reproduzindo durante os testes, confirmando sua adaptação para metabolizar o cobre.

A análise do perfil proteômico do fungo *A .niger* VC mostrou a sub expressão de proteínas em resposta ao estresse oxidativo causado pelo cobre. A exposição das células de *A.niger* VC ao cobre inibiu a expressão protéica, exceto das proteínas de choque térmico HSPs e SOD, que neutralizam o estresse oxidativo. Isto sugere que a adaptação a ambiente contaminado com metais confere aos fungos estudados vantagens adaptativas frente a exposição aos íons cobre. Em presença do metal foi observada a expressão de proteínas biomarcadoras como HSP 60 e superóxido desmutase [Cu-Zn] que apresentam características de absorção de metais.

O perfil proteômico do fungo *R.microsporus* VC mostrou super expressão de proteínas em resposta ao estresse de cobre, aumentando a presença das proteínas HSPs, sugerindo a ativação de vias metabólicas responsáveis pela resposta ao estresse oxidativo e absorção de cobre, sendo identificadas como proteínas biomarcadoras HSP 70, HSP 78, HSP 90. A super expressão de metaloproteínas no *R.microsporus* VC indica que a cadeia

polipeptídica ligada a íons divalentes geram espécies reativas de oxigênio, sugerindo alteração das vias metabólicas, devido à mudança de estado ou atividade celular.

Os resultados proteômicos mostraram que o fungo autóctone à mina, adaptado às condições de estresses por exposição à diversos íons metálicos, expressou diferencialmente suas proteínas em resposta à ausência ou presença de cobre na cultura. Os resultados mostram que a resposta dos fungos ao cobre envolvem a expressão de proteínas responsáveis por diferentes processos celulares, como metabolismo energético e estresse oxidativo. As alterações do metabolismo das espécies *A.niger* VC e *R.microsporus* VC, isolados do ambiente de mina, sugerem a expressão de mecanismo de resistência ao cobre dos fungos, mesmo já estando adaptados a diferentes espécies de íons metálicos. Proteínas de estresse oxidativo encontram-se associadas à membrana plasmática e vias metabólicas que mantêm a homeostase frente ao cobre.

Deste modo, os fungos *A.niger* VC e *R.microsporus* VC descritos neste trabalho, apresentaram potencial em processos de biorremediação e biolixiviação de rejeitos de mineração e industriais. Além disso, o profundo conhecimento de proteínas relacionadas ao estresse de cobre em fungos poderão torná-los biomarcadores ambientais, guiando futuras aplicações destes fungos nos processos de biorremediação líquida.

8 PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS

1. ALVES, L. A.C.; COUTO, T.M.; CIAMPONI, A.L.; FAVA, M.; **DIAS, Meriellen**; MENDES, M. A. MALDI Biotyper Analysis of Microorganisms Present in Saliva of Chronic Kidney Disease Individuals and their Association with Periodontal Disease. In: American Society for Mass Spectrometry, 2015, San Louis. MALDI Biotyper Analysis of Microorganisms Present in Saliva of Chronic Kidney Disease Individuals and their Association with Periodontal Disease, 2015.
2. ALVES, L.A.C.; COUTO, T.M.; WATANABE, A.; **DIAS, Meriellen**; MENDES, M.A. Identification of Microorganisms in Biofluids of Individuals with periodontitis and Chronic Kidney Disease using Maldi Biotyper. In: Americam Society for Mass Spectrometry, 2016, San Antonio, Tx. Identification of Microorganisms in Biofluids of Individuals with periodontitis and Chronic Kidney Disease using Maldi Biotyper, 2016.
3. **DIAS, Meriellen**; ANDRADE, L.M.; SANCEZ, E.E.R.; MENDES, M.A. Proteomic study of Rhizopus microsporus fungus growing in presence and absence of copper. In: American Society Mass Spectrometry, 2016, San Antonio, Tx. 64th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2016.
4. ALVES, L.A.C.; SOUZA, R.C.; SILVA, T.M.C.; **DIAS, Meriellen**; GARRIDO, D.; MENDES, M. A.; CIAMPONI, A.L. Identification of salivary metabolomics biomarkers of chronic kidney disease and their association with periodontitis. In: Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2017, Indianapolis-IN. 65th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2017.
5. SOUZA, R.C.; ALVES, L.A.C.; SILVA, T.M.C.; **DIAS, Meriellen**; MENDES, M.A.; CIAMPONI, A.L. Oral microbiota in Down syndrome individuals: Identification by MALDI-Biotyper. In: Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2017, Indianapolis-IN. 65th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2017.
6. ANDRADE, C.J.; **DIAS, Meriellen**; ANDRADE, L.M.; DELARMELINA, C.; DUARTE, M.C.T.; MENDES, M.A.; NASCIMENTO, C.O. Isolated Pseudomonas aeruginosa from mining site: proteome changes due to the copper. In: Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2017, Indianapolis, IN. 65th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2017.
7. ANDRADE, L.M.; **DIAS, Meriellen**; ANDRADE, C.J.; MENDES, M.A. Proteomic of microalgaeChlorella kessleri cultivation under stressed condition induced by copper ions. In: Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2017, Indianapolis- IN. 65th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2017.
8. **DIAS, Meriellen**; ANDRADE, L.M.; SANCEZ, E.E.R.; MENDES, M.A. Comparison of proteomic profile of the Aspergillus niger fungus (ATCC 11414 and Savage) growing in presence of copper.. In: American Society Mass Spectrometry, 2017, Indianapolis-IN. 65th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2017.

9 PUBLICAÇÕES EM REVISTA CIENTÍFICA

1. ALVES LAC, SOUZA RC, SILVA TMC, WATANABE A, **DIAS Meriellen**, MENDES MA, CIAMPONI AL. Identification of microorganisms in biofluids of individuals with periodontitis and chronic kidney disease using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. RCM. Rapid Communications in Mass Spectrometry **JCR**, v. 30, p. 1228-1232, 2016.
2. Cristiano J Andrade, Lidiane M Andrade, **Meriellen Dias**, Maria A Mendes and Claudio AO Nascimento. Isolated Pseudomonas Aeruginosa from Mining Site: Proteome Changes Due to Presence of Copper. Current Trends in Analytical and Bioanalytical Chemistry v1, p. 42-49, 2017.

3. Lidiane M Andrade, Cristiano J Andrade, **Meriellen Dias**, Claudio AO Nascimento and Maria A Mendes. Chlorella and Spirulina Microalgae as Sources of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements; an Overview. MOJ Food Processing & Technology v. 6: 00144, 2018.

Aceito

Levy Anderson César Alves' Rafael Celestino Souza', Taciana Mara Couto da Silva, Deise Garrido' **Meriellen Dias**, Andreia Watanabe, Claudio Augusto Oller do Nascimento, Maria Anita Mendes. Ana Lúcia Ciamponi Urine metabolomics profile of adolescents with chronic kidney disease, Metabolomics 2018

Submetido

1. **Meriellen Dias**, José Thalles Jocelino Gomes de Lacerda, Lidiane Maria de Andrade, Claudio Augusto Oller do Nascimento, Enrique Eduardo Rozas, Maria Anita Mendes. Copper exposure effects on *Aspergillus niger* fungus proteome isolated from mine environmental. Journal of Hazardous Materials
2. Taliana Kênia Alencar Bezerra, José Thalles Jocelino Gomes de Lacerda, Maria Aparecida Juliano, Maria Anita Mendes, **Meriellen Dias**, Marcelo Antônio Morgano, Maria Teresa Bertoldo Pacheco, Marta Suely Madruga. Chelating and antioxidant capacity of peptides from chicken combs and wattles. Food Research International.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

<http://www.mme.gov.br/documents/1138775/1256652/P37_RT63_Perfil_do_Cobre.pdf/68976b6f-13e9-4f1a-adde-c435aacbb009> Acesso em: 09 de maio de 2016.

AKSU Z., CALIK A., DURSUN A. Y., DEMERCAN Z. Bisorption of iron (III)- cyanide complex anions to *Rhizopus arrhizus*: application of adsorption isotherms. *Process Biochemistry*. 1999, v 34, p. 483-491.

ALI H.K.Q., ZULKALI M.M.D. Design Aspects of Bioreactors for Solid-state Fermentation: A Review. *Chemical and biochemical engineering quarterly*. 2011, v.25, p. 255-266.

ANAHID S., YAGHMAEI S., GHOBADINEJAD Z. Heavy metal tolerance of fungi. *Scientia Iranica*. 2011, v.18, p. 502-508.

ASKEW C., SELAM A., EPP E., HOGUES H., MULLICK A., NANTELL A., WHITEWAY M. Transcriptional Regulation of Carbohydrate Metabolism in the Human Pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2009, v 5(10), p.1-20.

ATSDR- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for copper. New York, 2004, p. 314.

BAKER S.E., THYKAER J., ADNEY W.S., BRETTIN T.S., BROCKMAN F.J., D'HAESELEER P., MARTINEZ A.D., MILLER R.M., ROKHSAR D.S., SCHADT C.W., TOROK T., TUSKAN G., BENNETT J., BERKA R.M., BRIGGS S.P., HEITMAN J., TAYLOR J., TURGEON B.G., WERNER-WASHBURNE M., HIMMEL M.E. Fungal genome sequencing and bioenergy. *Fungal Biology Reviews*. 2008, v. 22, p. 1–5.

BANCI L., BERTINI I., CIOFI-BAFFONI S., D'ALESSANDRO A., JAISWAL D. Copper exposure effects on yeast mitochondrial proteome. *Journal of Proteomics*. 2011, v. 74, (11SI), p. 2522–2535.

BARROS B.H.R., DA SILVA S.H., MARQUES E.R., ROSA J.C., YATSUDA A.P., ROBERTS D.W., BRAGA G.U.L. A proteomic approach to identifying proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. *Fungal biology*. 2010, v. 114, n. 7, p. 572–579.

BATEMAN R.H., CARRUTHERS R., HOYES J.B., JONES C., LANGRIDGE J.I., MILLAR A., VISSERS J.P.C. A Novel Precursor Ion Discovery Method on a Hybrid Quadrupole Orthogonal Acceleration Time-of-Flight (Q-TOF) Mass Spectrometer for Studying Protein Phosphorylation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2002, v. 13, p. 792-803.

BRUKER- MALDI-TOF Mass Spectrometry: microflex LRF Operator Training, v.2, p. 1-49, 2013.

BOUWS H., WATTENBERG A., ZORN H. Fungal secretomes – nature's toolbox for white biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, v. 80, p. 381-388.

CALLENDER E. Heavy Metals in the Environment-Historical Trends Treatise on Geochemistry. 2007, v.3, p. 67-105.

CAROLIS DE E., POSTERARO B., LASS-FLÖRL C., VELLA A., FLORIO A.R., TORELLI R., GIRMENIA C., COLOZZA C., TORTORANO A.M., SANGUINETTI M., FADDA G. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clinical Microbiology and infection. 2012, v 18, p.475-484.

CHAMBERGO S.F., VALENCIA Y.E. Fungal biodiversity to biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology. 2016, v. 100, p. 2567-2577.

CHANG B.V., CHANG Y.M. Biodegradation of toxic chemicals by *Pleurotus eryngii* in submerged fermentation and solid-state fermentation. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2014, p.1-7.

CHIU J., WONG W.H.J, HOGG J.P. Redox Regulation of Methionine Aminopeptidase 2 Activity. Journal of Biological Chemistry. 2014, v. 289, p. 15035-15043.

COBINE A.P., PIERREL F., WINGE D.R. Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2006, v. 1763, p. 759-772.

COBRE-NAUTILUS. Disponível em: <nautilus.fis.uc.pt/st2.5/scenes-p/elem/e02900.html>. Acesso em: 27 junho. 2016.

CORRÊA R.S., BENTO M.A.B. Qualidade do substrato minerado de uma área de empréstimo revegetada no Distrito Federal. Revista Brasileira de Ciência do Solo. 2010, v. 34, p. 1435-1443. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832010000400039>.

CROTTI A.E.M., VESSECCHI R., LOPES L.C., LOPES N.P. Espectrometria de massas com ionização por electrospray: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. Química Nova. 2006, v. 29, p. 287-292.

DAS R.K., BRAR S.K., VERMA M. Potential use of pulp and paper solid waste for the bio-production of fumaric acid through submerged and solid state fermentation. Journal of Cleaner Production. 2015, p.1-10.

DEY B.T., CHAKRABORTY S., JAIN K.R.K., SHARMA A., KUHAD C.R. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. Trends in Food Science & Technology. 2016, p.60-70.

DHANKHAR R., HOODA A. Fungal biosorption- an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. Environmental technology. 2011, v.32 p. 467-491.

DI CIERO L., BELLATO C.M. PROTEOMA: Avancos Recentes em Tecnicas de Eletroforese Bidimensional e Espectrometria de Massas. Biotecnologia Ciencia e Desenvolvimento. 2003, v. 29, p. 158-164.

DING C., FESTA R.A., SUN T., WANG Z. Iron and copper as virulence modulators in human fungal pathogens. *Molecular microbiology*. 2014, v 93, p.10-23.

DNPM – Departamento Nacional de Produção Mineral / Sumário Mineral de 2015. Disponível em: <<http://www.dnpm.gov.br/dnpm/publicacoes/serie-estatisticas-e-economia-mineral/sumario-mineral/sumario-mineral-brasileiro-2015>>. Acesso em: 20 de Dezembro de 2017.

DOMON B., AEBERSOLD R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 2006, v. 312, p. 212-217.

EFREMENKO E., SPIRICHEVA O., VARFOLOMEYEV S., LOZINSKY V. *Rhizopus oryzae* fungus cells producing L(+)-lactic acid: kinetic and metabolic parameters of free and PVA-cryogel-entrapped mycelium. *Microbiology and Biotechnology*. 2006, v.72, p. 480-485.

FARIAS Y.M.M. Dissertação de mestrado: Biossorção de metais pesados pelo fungo *penicillium corylophilum*. Universidade do Rio de Janeiro, 2014.

FEHRENBACH E., NIESS A.M. Role of heat shock proteins in the exercise response. *Exercise Immunology Review*. 1999, v.5, p. 57-77.

FENG X., XU J., LIANG Y., CHEN G., FAN X., Li Y. A proteomic-based investigation of potential copper-responsive biomarkers: Proteins, conceptual networks, and metabolic pathways featuring *Penicillium janthinellum* from a heavy metal-polluted ecological niche. *Microbiology Open*. 2017, v. 6. doi:10.1002/mbo3.485.

FEDER, M. E., HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*. 1999, v.61, p. 243–282.

GADD G.D., FORMINA M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Biossource Technology*. 2014, v.160, p.3-14.

GADD G.M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*. 2004, v. 122, p. 109-119.

GADD, G.M., REED G., PUHLER A., STADLER P. Accumulation and transformation of metals by microorganisms. *Biotechnology, A Multi-volume Comprehensive Treatise*. 2001, v. 10, p. 225-264 (livro).

GOLLI-BENNOUR E., BACHA H. Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: Mycotoxins' exploration. *Toxicology*. 2011, v.287, p. 1-7.

GÖRG A., WEISS W., DUNN M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004, v. 4, p. 3665-3685.

GRAVES, P.R., HAYSTEAD T.A. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology*. 2002, v. 66, p. 39-63.

HAFERBURG G., KOTHE E. Metallomics: lessons for metalliferous soil remediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, v. 4, p. 1271-1280.

- HAGEDOORN P. Microbial Metalloproteomics. *Proteomes*. 2015, v.3, p. 424-439; doi:[10.3390/proteomes3040424](https://doi.org/10.3390/proteomes3040424).
- HAMZA I., GITLIN J.D. Copper chaperones for cytochrome c oxidase and human disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2002, v. 34, p. 381-388.
- HAN M.J., LEE S.Y., SOH S.T., NOH S.G., HAN W.H. Biotechnological applications of microbial proteomes. *Journal Biotechnol.* 2010, v. 145, p. 341-349.
- HANSEN G.H., LÜBECK M., FRISVAD J.C., LÜBECK P.S., ANDERSEN B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*. 2015, v.50, p.1327-1341.
- HECKER M., BECHER D., FUNCHS S., ENGELMANN S. A Proteomic view of cell physiology and virulence of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*. 2010, v.300, p. 76-87.
- HODGKINSON V., PETRIS M.J. Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *Journal of Biological Chemistry*. 2012, v.287, p. 13549-55.
- HONDORP E.R., MATTHEWS R.G. Oxidative Stress Inactivates Cobalamin-Independent Methionine Synthase (MetE) in *Escherichia coli*. *PLOS Biology*. (2004), v. 2(11):e336.
- ILYAS S., REHMAN A., VARELA A.C., SHEEHAN D. Redox Proteomics Changes in the Fungal Pathogen *Trichosporon asahii* on Arsenic Exposure: Identification of Protein Responses to Metal-Induced Oxidative Stress in an Environmentally-Sampled Isolate. *Plos One*. 2014, v.9.
- IRAZUSTA V., OBIS E., MORENO-CERMENO A., CABISCOL E., ROS J., TAMARIT J. Yeast frataxin mutants display decreased superoxide dismutase activity crucial to promote protein oxidative damage. *Free Radic Biol Med*. 2010, v. 48, p. 411–420.
- IRAZUSTA V., ESTÉVEZ C., AMOROSO M.J. Proteomic study of the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11 under copper stress. *Biometals*. 2012, v.25, p.517-527. <https://doi.org/10.1007/s10534-012-9531-0>.
- JAMIESON D.J. Oxidative stress responses of the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1998, v. 14, p.1511–1527.
- JIMENEZ R.S., DAL BOSCO S.M., CARVALHO W. A. Remoção de metais pesados de efluentes aquosos pela zeólita natural esolecita – influência da temperatura e do pH na adsorção em sistemas monoelementares. *Quim. Nova*. 2004, v. 27, p. 734-738.
- KAPOOR A., VIRARAGHAVAN T., CULLIMORE D.R. Removal of heavy metals using the fungus *A.niger*. *Bioresource Technology*. 1999, v. 70, p. 95-104.
- KAVAMURA V.N., ESPOSITO E. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology Advances*. 2010, v. 28, p. 61-69.

KITPREECHAVANICH V., MANEEBOON T., KAYANO Y., SAKAI K. Comparative Characterization of L-Lactic Acid-Producing Thermotolerant *Rhizopus* Fungi. Journal Bioscience and Bioengineering, 2008, v. 106, p. 541–546.

KLICH A.M. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. Mycologia, New York, 2002, v. 94, p. 21-27.

KODAL S.P., AKSU Z. Cationic surfactant-modified biosorption of anionic dyes by dried *Rhizopus arrhizus*. Environmental Technology. 2017, v.38, p. 2551-2561.

KORF E.P., MELO E.F.R.Q., THOMÉ A., ESCOSTEGUY P.A.V. Retenção de metais em solo da antiga área de disposição de resíduos sólidos urbanos de Passo Fundo – RS. Rev. Cienc. Ambient. 2008, v. 2, p. 43-60.

KRETSINGER, R.H.; UVERSKY V.M., PERMYAKOV E.A. *Encyclopedia of Metalloproteins*; Springer: Nova York, NY, EUA, 2013.

KRUMOVA E., KOSTADINOVA N., MITEVA-STALEVA J., GRYSHKO V., ANGELOVA. M. Cellular Response to Cu and Zn Induced oxidative stress in *Aspergillus fumigatus* isolated from polluted soils in Bulgaria. Journal Clean Soil Air Water. 2016, v.44: p.657-666.

LABBÉ S., PEÑA M.M., FERNANDES A.R., THIELE D.J. A copper-sensing transcription factor regulates iron uptake genes in *Schizosaccharomyces pombe*. The Journal of Biological Chemistry. 1999, v. 274 , p.36252 – 36260.

LALIOTI V., MURUAIS G., TSUCHIYA Y., PULIDO D., SANDOVAL V.I. Molecular mechanisms of copper homeostasis. Frontiers in Bioscience. 2009, v. 14, p. 4878–4903.

LIU Y.G., FAN T., ZENG G.M., LI X., TONG Q., YE F., ZHOU M., XU W.H., HUANG Y. Removal of cadmium and zinc ions from aqueous solutions by living *A.niger*. Transactions of Nonferrous Metals Society. 2006, v.16, p.681-686.

LI, Q., HARVEY L. M., MCNEIL B. Oxidative stress in industrial fungi. Critical review in Biotechnology. 2009, v. 29, p. 199–213.

LONG D.D., WANG Q.; HAN J.R. Biosorption of copper (II) from aqueous solutions by sclerotigenic *Aspergillus oryzae* G15. Water Environment Research. 2017, v. 89, p. 703-713.

LÓPEZ B.J., GÓMEZ A.J.L. Environmental proteomics and metallomics. Proteomics. 2006, v. 6, p. S51-S52.

MACHADO M.D., JANSSENS S., SOARES H.M., SOARES E.V. Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: advantages of using dead biomass. Journal of Applied Microbiology. 2009, v.106, p.1792–1804.

MAIO N., KIM K.S, SINGH A., ROUAULT T.A."A single adaptable cochaperone-scaffold complex delivers nascent iron-sulfur clusters to mammalian respiratory chain complexes I-III."Cell Metabolism. 2017, v. 25, p. 945-953.

MANN M, JENSEN ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology*. 2003, v. 21, p. 255-261.

MERTENS J.A., SKORY C.D. Isolation and characterization of a second glucoamylase gene without a starch binding domain from *Rhizopus oryzae*, *Enzyme and Microbial Technology*. 2007, v. 40, p. 874-880.

NARBERHAUS F., OBRIST M., FÜHRER F., LANGKLOTZ S. Degradation of cytoplasmic substrates by FtsH, a membrane-anchored protease with many talents. *Research in Microbiology*. 2009, v. 160, p. 652-659.

OLSSON L., NIELSEN J. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. *Trends in Biotechnology*. 1977, v.15, p.517-522.

PEL H.J., de WINDE J.H., ARCHER D.B., DYER P.S., HOFMANN G., SCHAAP P.J., et al.,. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *A.niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*. 2007, v. 25, p. 221-231.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R., EDWARDS, D. D.; PELCZAR, M. F. *Microbiologia, conceitos e aplicações*, v. 1, 2. ed., Makron Books, São Paulo, p.524, 1996.

PELLETIER B., BEAUDOIN J., MUKAI Y., LABBÉ S. Fep1, an iron sensor regulating iron transporter gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002, v. 277, p.22950 - 22958.

PINO G.H. Biossorção de metais pesados utilizando pó da casca de coco verde (*Cocos nucifera*). Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica), Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2005.

PITARCH A., SÁNCHEZ M., NOMBELA C., GIL C. Analysis of the *Candida albicans* proteome: I. Strategies and applications. *Journal of Chromatography B*. 2003, v. 787, p. 101–128.

PUIG S., THIELE D.J. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2002, v. 6, p. 171-180.

PUTZKE J., PUTZKE M.T.L. *Os Reinos dos Fungos*. Santa Cruz do Sul: EDUNISC. 2002, v. 2, p. 212.

RAGGAM R.B., SALZER H.J., MARTH E., HEILING B., PAULITSCH A.H., BUZINA W. Molecular detection and characterization of fungal heat shock protein 60. *Mycoses*. 2010. Doi: 10.1111/J.1439-0507.2010.01933.X.

RICHTER K., HSKBECK M., BUCHNER J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Molecular Cell*. 2010, v.40, p. 253-266.

ROBERTS, M. R., SALINAS, J., COLLINGE, D. B. 14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress. *Plant Molecular Biology*. 2002, v. 50, p. 1031–1039.

SAINT-PRIX F., BONQUIST L., Dequin S. Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP⁺-dependent

Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. *Microbiologia*. 2004, v.150, p. 2209-2220.

SANTORO M.G. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical Pharmacology*. 2000, v.59, p.55-63.

SARI A., TUZEN M. Knetic and equilibrium studies of biosorption of Pb (II) and Cd (II) from aqueous solution by macrofungus (*Amanita rubescens*) biomass. *Journal of Hazzardous Materials*. 2009, v.164, p.1004-1011.

SEDMAN J.J., GROOSBERG G.S.E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Analytical Biochemistry*. 1997, v. 79, p. 544–552.

SERRANO R., BERNAL D., SIMON E., ARINO J. Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, v. 279, p.19698-19704.

SILAR ET AL., HARMS H., SCHLOSSER D. & WICK L. Y. Applied and industrial microbiology untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals see also. *Nature Reviews. Microbiology*. 2011, v 9, p.177-192. doi:10.1038/Nrmicro2519.

SIMEONOV L.I, KOCHUBOVSKI M.V., SIMEONOVA B.G. (Eds.). Environmental heavy metal pollution and effects on child mental development. Risk Assessment and Prevention Strategies. Series: Nato Science for Peace and Security Series C, Environmental Security. 1st. 2011, p. 361, Hardcover.

SOCOL C.R. Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico, biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e Basidiomycetozos do gênero *Pleurotus*. Tese (Professor Titular). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 1994, p. 228.

SPIER M.R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas (α -amilase e amiloglicosidase) por fermentação no estado sólido. 2005. 178p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

STERNBERG D., VIJAYAKUMAR P., REESE E.T. Beta-glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Canadian Journal of Microbiology*. 1977, v. 23, p. 139-147.

TESSIER W.D., MEADEN P.G., DICKINSON F.M., MIDGLEY M. Identification and disruption of the gene encoding the K(+)-activated acetaldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*. 1998, v.164, p. 29–34.

THE UNI CONSORTIUM^{1,2,3,4}. Uniprot: The Universal Protein Knowledgebase, *nucleic acids research*. 2007, v.45, p.158–169, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1099>.

TORTORA G.J., FUNKE B.R., CASE C.L. *Microbiologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

TSEKOVA K., GALABOVA D., TODOROVA. K., ILIEVA S. Phosphatase activity and copper uptake during growth of *A.niger*. Process Biochemistry. 2002, v. 37, p. 753–758.

UETA J., PEREIRA N.L., SHUHAMA I.K., CERDEIRA A.L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação: microrganismos degradadores do herbicida atrazina. Biotecnologia. 1999, v. 10, p. 10-13.

URUNAKUMARA K.K.I.U., XUECHENG Z. Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. Journal of Ocean University of China. 2008, v.7, p. 66-64.

VELLUCCI V.F., GYGAX S.E., HOSTETTER M.K. Involvement of *Candida albicans* pyruvate dehydrogenase complex protein X (Pdx1) in filamentation. Fungal Genetics and Biology. 2007, v.44, p. 979–990.

VOTH W., SCHICK M., GATES S., LI S., VILARDI F., GOSTIMSKAYA I., SOUTHWORTH R.D., SCHWAPPACH B., JAKOB U. The Protein Targeting Factor Get3 Functions as ATP-Independent Chaperone under Oxidative Stress Conditions. Molecular Cell. 2014, v. 56, p. 116-127.

VULLO D.L. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. Química Viva. 2003, v.2, p. 93-104.

WAIHUNG L., CHUA H., LAM KH B.I. S.P. A comparative investigation on the biosorption of lead by filamentous fungal biomass. Chemosphere. 1999, v. 39, p. 2723-2736.

WALDRON K.J., RUTHERFORD J.C., FORD D., ROBINSON N.J. Metalloproteins and metal sensing. Nature. 2009, v 460, p.823-830.

WELCH W.J. Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and disease. Physiological Reviews. 1992, v. 72, p. 1063-1081.

WHITMAN W.B., COLEMAN D.C., WIEBE W.J. Prokaryotes: the unseen majority. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998, v. 95, p. 6578-6583.

WILHELM M., SCHLEGL J., HAHNE H., et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. Nature. 2014, v. 508, p. 582-587.

WILKINS M.R., SANCHEZ J.C., GOOLEY A.A., APPEL R.D., HUMPHERY-SMITH I., HOCHSTRASSER D.F., WILLIAMS K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. 1996, v.13, p. 19-50.

WITTMANN-LIEBOLD B.; GRAACK H.-R.; POHL T. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. Proteomics, v. 6, p. 4688–4703, 2006.

WU Z., TSUMURA Y., BLOMQUIST G., WANG XIAO-R.U. 18S rRNA Gene variation among common airborne fungi, and development of specific oligonucleotide probes for the detection of fungal isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, v.69, p. 5389-5397.

XIA J., WU S., ZHANG R. ZHANG C, HE H, JIANG H, NIE Z, QIU G. Effects of copper exposure on expression of glutathione-related genes in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Current Microbiology*. 2011 v. 62: p.1460-1466. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9881-9>.

ZHANG J., XIN L., SHAN B., CHEN W., XIE M., YUEN D., ZHANG W., ZHANG Z., LAJOIE G.A., MA B. PEAKS DB: De Novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012, v. 11, p.1-8.

ZHANG W., LI F., NIE L. Integrating multiple “omics” analysis for microbial biology: application and methodologies. *Microbiology*. 2010, v. 156, p. 287-301.

ZHAO B., POH C.L. Insights into environmental bioremediation by microorganisms through functional genomics and proteomics. *Proteomics*. 2008, v.8, p. 874-881.

ANEXO I

Proteínas diferencialmente expressas em
Aspergillus niger VC

Tabela 1: Proteínas diferencialmente identificadas por espectrometria de massa do fungo *A.niger* VC na ausência de íons Cu^{2+} (Uniprot, <http://www.uniprot.org>).

#Acesso	-10lgP	Convergência (%)	#Peptídeos	Proteínas
A0A117DYT5	44342	52	37	Cobalamin-independent methionine synthase
A0A100IED2	42355	46	36	Elongation factor
A0A117DXF8	41556	34	26	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component
A5AB29	41030	49	22	Glutamate decarboxylase (EC 4.1.1.15)
A0A117E173	34101	38	22	Hsp70 chaperone
A0A100IAD1	34517	25	16	Aminopeptidase C
A0A100IFA7	30427	22	13	Aconitase family protein
A0A124BUR9	24060	6	13	Glycogen debranching enzyme Gdb1
A2QUW9	24336	38	12	Aspergillus niger contig An10c0020, genomic contig (EC 1.1.1.-)
A2R8S1	28850	21	12	Aspergillus niger contig An16c0250, genomic contig (EC 3.4.14.-)
A0A100IA47	25819	15	12	Bifunctional purine biosynthesis protein Ade16
A0A117E141	24430	45	10	ATP synthase subunit 4, mitochondrial
G3Y9G5	21056	11	9	Uncharacterized protein
A0A172CE91	22513	26	8	Translation elongation factor 1-alpha (Fragment)
A2R7U3	20162	29	7	Aspergillus niger contig An16c0170, genomic contig (EC 1.1.1.-)
A0A117DZF6	30535	12	7	ER to Golgi transport protein Yif1
A0A100IQI4	16016	11	6	ABC transporter
E2PSQ3	19859	16	6	Aspergillus niger contig An07c0160, genomic contig
A2R070	15895	18	6	Aspergillus niger contig An12c0240, genomic contig
G3XNR9	15823	22	6	Methyltransferase (Fragment)
A0A100IUG8	17191	23	6	Short-chain dehydrogenase/reductase family protein
G3XVV7	15865	30	6	Uncharacterized protein
G3Y3M5	18070	7	6	Uncharacterized protein
G3Y8V4	19884	12	6	Uncharacterized protein

G3XN30	23435	41	6	Uncharacterized protein (Fragment)
G3YG52	13410	18	6	Uncharacterized protein (Fragment)
A2QA24	19439	14	5	Aspergillus niger contig An01c0330, genomic contig
A2QLH0	13842	14	5	Aspergillus niger contig An06c0070, genomic contig
A2R9C5	17031	13	5	Aspergillus niger contig An17c0040, genomic contig
A0A124BY94	14760	29	5	Uncharacterized protein
A2QJ58	14808	6	5	Uncharacterized protein
G3XUS2	16232	5	5	Uncharacterized protein
G3YG69	13457	29	5	Uncharacterized protein (Fragment)
A2QLN6	13543	11	4	Aspergillus niger contig An06c0090, genomic contig
A2QSZ5	15832	14	4	Aspergillus niger contig An09c0020, genomic contig (EC 2.1.1.-)
A2R040	16212	21	4	Aspergillus niger contig An12c0220, genomic contig
A2R6K2	17243	17	4	Aspergillus niger contig An16c0010, genomic contig (EC 2.1.1.41)
A2R7Q2	16451	17	4	Aspergillus niger contig An16c0160, genomic contig (EC 2.4.1.83)
A0A100IN43	11767	11	4	Survival factor 1
G3XZZ8	12283	10	4	Uncharacterized protein
G3Y0V9	14251	18	4	V-type proton ATPase subunit
A0A124BXJ2	9164	12	3	2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase
A0A124BUY0	17585	9	3	2-methylcitrate dehydratase
A0A100ILE8	17337	14	3	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase
A2Q988	13440	11	3	Aspergillus niger contig An01c0250, genomic contig (EC 1.2.1.-)
A2Q9M7	14515	10	3	Aspergillus niger contig An01c0290, genomic contig
A2QF99	8924	6	3	Aspergillus niger contig An02c0450, genomic contig
A2QPJ6	13181	17	3	Aspergillus niger contig An07c0340, genomic contig (EC 3.1.1.45)
A2QPK9	9380	5	3	Aspergillus niger contig An07c0370, genomic contig
A2R469	9522	12	3	Aspergillus niger contig An14c0200, genomic contig
E2PSW1	15301	11	3	Aspergillus niger contig An17c0060, genomic contig (EC 2.7.1.20)
A2RAC5	11531	8	3	Aspergillus niger contig An18c0080, genomic contig (EC 1.14.-.-)

A0A100IK26	19784	7	3	Cytochrome P450 monooxygenase
A0A117DZE0	8134	9	3	Glutamine synthetase
A0A100I2M0	8923	9	3	Mitochondrial protein import protein Mas5
P55804	13684	49	3	NADP(+)-dependent glycerol dehydrogenase (EC 1.1.1.72) (Fragments)
G3Y6S2	12580	2	3	Pre-mRNA splicing helicase
G3XPH6	9417	48	3	Profilin
A0A117E1L4	15559	12	3	Proteasome component PRE2
A0A124BWC0	8520	5	3	SPX domain protein
A0A100IQF6	14953	9	3	Uncharacterized protein
G3XMQ1	16611	7	3	Uncharacterized protein
G3XNM7	11762	38	3	Uncharacterized protein
G3XXV3	14109	12	3	Uncharacterized protein
G3YAH5	13996	2	3	Uncharacterized protein
A0A117E1H1	15384	4	2	Acetyl-CoA-acetyltransferase
Q00217	14156	6	2	Alpha, alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 2 (EC 2.4.1.15) (Trehalose-6-phosphate synthase) (UDP-glucose-glucosephosphate glucosyltransferase)
A2QEV0	11465	11	2	Altered inheritance of mitochondria protein 24, mitochondrial
G3Y3K5	7436	6	2	Arginase (EC 3.5.3.1)
D8FSP0	5446	9	2	Arylamine N-acetyltransferase 2
A2QAY4	8539	3	2	Aspergillus niger contig An01c0400, genomic contig
A2QDZ5	8616	4	2	Aspergillus niger contig An02c0270, genomic contig
A2QP65	7010	11	2	Aspergillus niger contig An07c0260, genomic contig (EC 3.5.1.19)
A2QUB8	12235	5	2	Aspergillus niger contig An09c0150, genomic contig (EC 2.6.1.5)
A2QUT4	8790	9	2	Aspergillus niger contig An09c0220, genomic contig (EC 2.5.1.49)
A2QV31	6375	8	2	Aspergillus niger contig An10c0050, genomic contig (EC 2.7.8.23)
A2QVE0	14178	6	2	Aspergillus niger contig An11c0040, genomic contig (EC 3.5.4.3)
A2QWZ5	7891	5	2	Aspergillus niger contig An11c0240, genomic contig (EC 1.14.14.3)

A5ABQ5	7628	3	2	Aspergillus niger contig An11c0340, genomic contig
A2QYI1	11595	3	2	Aspergillus niger contig An12c0050, genomic contig (EC 1.14.-.-)
A2R093	8994	26	2	Aspergillus niger contig An12c0260, genomic contig (EC 6.3.2.19)
A2R0Z5	7851	2	2	Aspergillus niger contig An12c0350, genomic contig (EC 2.4.1.16)
A2R7M4	9894	16	2	Aspergillus niger contig An16c0150, genomic contig
A2RAW5	13525	19	2	Aspergillus niger contig An18c0160, genomic contig
A0A100IAI5	7751	7	2	AT DNA binding protein
A0A100I5M3	9296	4	2	Autophagy protein Atg20
A0A117E1A3	7335	2	2	Chitin synthase G
A0A124BXP0	9409	4	2	Cytochrome P450 alkane hydroxylase
A0A100IAY7	10332	3	2	Glycerol kinase
A0A124BUT2	10627	6	2	Glyoxylate reductase
A0A117E0Z1	14142	7	2	Guanine deaminase
G3Y376	10223	4	2	Imidazoleglycerol phosphate synthase (EC 2.4.2.-) (EC 4.1.3.-)
A0A100IF33	7836	3	2	Mitochondrial carrier protein
A0A100IHK0	5442	1	2	Pentafunctional AROM polypeptide [Includes: 3-dehydroquinase dehydratase (3-dehydroquinase) (EC 4.2.1.10); 3-dehydroquinase synthase (DHQS) (EC 4.2.3.4); 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase (EC 2.5.1.19) (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) (EPSP synthase) (EPSPS); Shikimate dehydrogenase (EC 1.1.1.25); Shikimate kinase (SK) (EC 2.7.1.71)]
G3YHN0	4955	2	2	Pentafunctional AROM polypeptide [Includes: 3-dehydroquinase dehydratase (3-dehydroquinase) (EC 4.2.1.10); 3-dehydroquinase synthase (DHQS) (EC 4.2.3.4); 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase (EC 2.5.1.19) (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) (EPSP synthase) (EPSPS); Shikimate dehydrogenase (EC 1.1.1.25); Shikimate kinase (SK) (EC 2.7.1.71)]
G3Y6C3	7253	13	2	Phosphoglycerate mutase (EC 5.4.2.-)
A2QHM1	9657	8	2	Protein transport protein sec13
A0A100IBY6	7675	2	2	PT repeat family protein

A0A100INZ0	12228	19	2	Rho GDP-dissociation inhibitor
G3Y1A2	11186	4	2	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit
A0A100IGK5	11015	8	2	Short-chain dehydrogenases/reductase
G3Y384	11607	4	2	Ubiquitinyl hydrolase 1 (EC 3.4.19.12)
A0A117DWH9	9675	4	2	Uncharacterized protein
A0A124BYS2	11374	3	2	Uncharacterized protein
G3XPL1	4939	2	2	Uncharacterized protein
G3Y1D3	7777	2	2	Uncharacterized protein
G3YBW1	13660	7	2	Uncharacterized protein
G3XVI7	5197	13	2	Uncharacterized protein (Fragment)
G3Y1T0	9354	1	2	Uncharacterized protein (Fragment)
A0A100IRD4	3450	4	1	2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase
A0A100IJM4	4447	3	1	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase
G3YDC2	4562	7	1	30kD heat shock protein
A2QCE1	6484	2	1	3-isopropylmalate dehydratase (EC 4.2.1.33) (Alpha-IPM isomerase) (Isopropylmalate isomerase)
A0A100IIB7	8173	4	1	3-ketoacyl-CoA ketothiolase
A0A117E4B2	8964	4	1	3-ketoacyl-CoA thiolase
A0A100IB61	4838	3	1	3-ketoacyl-coA thiolase peroxisomal A
A0A124BWJ7	3803	1	1	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit alpha
A0A100ICL4	6905	2	1	6-phosphofructo-2-kinase 1
A0A100IJH8	8847	3	1	AAA family ATPase
A0A100ICU6	3477	1	1	ABC transporter
A0A100IST5	6953	2	1	Acetolactate synthase
A0A124BZ14	5028	4	1	Actin-bundling protein Sac6
A0A117E1J6	4019	6	1	ADP-ribose pyrophosphatase

A0A117DY12	3198	2	1	Alpha/beta hydrolase
A0A100IT77	3896	2	1	Alpha-ketoglutarate dependent xanthine dioxygenase
A0A100I735	4259	2	1	Aminoadipic semialdehyde synthase
A0A117DWN7	3268	4	1	Anthranilate phosphoribosyltransferase
A0A100IHG1	4304	1	1	Anucleate primary sterigmata protein A
A0A100IMZ2	4065	3	1	Arginase family protein
A2Q7C2	4484	5	1	Aspergillus niger contig An01c0020, genomic contig
A2Q7W4	6259	4	1	Aspergillus niger contig An01c0080, genomic contig
A2Q878	5311	6	1	Aspergillus niger contig An01c0100, genomic contig (EC 5.3.3.-)
A2QA94	7558	3	1	Aspergillus niger contig An01c0330, genomic contig (EC 3.5.2.3)
A2QBA2	15111	5	1	Aspergillus niger contig An01c0470, genomic contig
A2QCH0	3524	3	1	Aspergillus niger contig An02c0090, genomic contig
A5AAH4	6361	2	1	Aspergillus niger contig An02c0310, genomic contig (EC 1.1.2.4)
A2QEN3	6491	4	1	Aspergillus niger contig An02c0360, genomic contig
A2QGD7	7178	4	1	Aspergillus niger contig An03c0080, genomic contig
A2QGV0	3710	6	1	Aspergillus niger contig An03c0130, genomic contig
A2QHC2	5183	1	1	Aspergillus niger contig An03c0200, genomic contig (EC 2.4.1.16)
A2QHU7	3660	4	1	Aspergillus niger contig An04c0070, genomic contig
A2QIG3	4466	3	1	Aspergillus niger contig An04c0140, genomic contig
A2QIL1	7092	2	1	Aspergillus niger contig An04c0140, genomic contig
A2QMT8	8564	4	1	Aspergillus niger contig An07c0080, genomic contig
A2QMV4	6618	2	1	Aspergillus niger contig An07c0080, genomic contig
A2QMW7	8395	5	1	Aspergillus niger contig An07c0090, genomic contig (EC 1.1.1.-)
A2QMY3	3282	2	1	Aspergillus niger contig An07c0100, genomic contig
A2QPA1	8536	1	1	Aspergillus niger contig An07c0300, genomic contig
A2QPL2	4663	4	1	Aspergillus niger contig An07c0370, genomic contig
A2QQR8	3750	2	1	Aspergillus niger contig An08c0100, genomic contig (EC 3.4.21.-)
A2QRB1	8981	4	1	Aspergillus niger contig An08c0130, genomic contig (EC 2.3.1.16)

A2QTP3	3318	2	1	Aspergillus niger contig An09c0070, genomic contig
A2QUW6	4982	1	1	Aspergillus niger contig An10c0020, genomic contig
A5ABF6	5734	2	1	Aspergillus niger contig An11c0010, genomic contig
A2QVT6	8488	6	1	Aspergillus niger contig An11c0090, genomic contig
A2QWF8	8209	2	1	Aspergillus niger contig An11c0200, genomic contig (Fragment)
A5ABR4	4825	3	1	Aspergillus niger contig An11c0340, genomic contig
A2QYN6	3300	2	1	Aspergillus niger contig An12c0060, genomic contig (EC 2.5.1.29)
A2R0E9	12159	3	1	Aspergillus niger contig An12c0280, genomic contig (EC 3.4.-.-)
A2R1M5	3687	2	1	Aspergillus niger contig An13c0060, genomic contig
A2R3K0	4049	1	1	Aspergillus niger contig An14c0160, genomic contig
A2R3M8	3285	1	1	Aspergillus niger contig An14c0170, genomic contig
A2R3P5	4230	2	1	Aspergillus niger contig An14c0170, genomic contig
A2R3T5	6436	5	1	Aspergillus niger contig An14c0180, genomic contig
A2R3U3	4230	2	1	Aspergillus niger contig An14c0180, genomic contig
A2R424	3765	2	1	Aspergillus niger contig An14c0190, genomic contig
A2R5V8	5229	1	1	Aspergillus niger contig An15c0200, genomic contig
A2R620	3808	1	1	Aspergillus niger contig An15c0210, genomic contig
A2R8L9	4274	2	1	Aspergillus niger contig An16c0230, genomic contig
A2R9B0	11854	6	1	Aspergillus niger contig An17c0030, genomic contig
A2RB76	7983	3	1	Aspergillus niger contig An18c0170, genomic contig
A2QPN1	3656	14	1	Autophagy-related protein 8 (Autophagy-related ubiquitin-like modifier atg8)
A0A100ILA6	4933	3	1	BNR/Asp-box repeat protein
A0A100IBT0	6822	3	1	Branched-chain amino acid aminotransferase
A0A117DZ96	6696	3	1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase
G3Y5W3	4845	1	1	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit
A2QKY5	3571	2	1	Carboxypeptidase (EC 3.4.16.-)
A0A100INJ4	4470	2	1	CBS domain protein

A0A100IP67	10485	4	1	Chitin synthase activator
T1SGS1	7370	3	1	Citrate synthase (Fragment)
A0A0H5ARK2	5654	6	1	Citrate transport protein (Mitochondrial tricarboxylate transporter)
A0A100IKL7	3675	2	1	CMGC/SRPK protein kinase
A0A117DXV8	4594	6	1	Coiled-coil domain-containing protein
A0A124BWT6	4742	2	1	Cyanate hydratase (Cyanase) (EC 4.2.1.104) (Cyanate hydrolase) (Cyanate lyase)
A0A100IAM4	7092	1	1	Dead box ATP-dependent rna helicase
G3Y417	8674	4	1	Decarboxylase yanB (EC 4.1.1.-) (Yanuthone D synthesis protein B)
G3XN75	4707	5	1	Dehydrogenase
A2QAJ5	5625	4	1	Dipeptidase (EC 3.4.13.19)
G3XMY2	7405	1	1	DNA helicase (EC 3.6.4.12)
A0A117DXI6	3456	1	1	DNA polymerase epsilon subunit C
A0A100ITR6	6887	4	1	DnaJ domain protein
A0A117E1K1	5384	3	1	Endo-1,3-beta-glucanase eglC
A0A124BWC6	4232	9	1	ER-derived vesicles protein ERV14
A0A100IJ67	6664	3	1	Fe-containing alcohol dehydrogenase
A0A100INL7	5856	8	1	Fumarylacetoacetate hydrolase family protein
A0A100I3X8	3440	3	1	Gamma-glutamyltranspeptidase
A0A100IPJ9	5786	5	1	GDSL lipase/acylhydrolase family protein
A0A100I6Y8	3675	3	1	Glucosylglycosyltransferase
G3Y3M0	8507	5	1	Homoserine dehydrogenase (HDH) (EC 1.1.1.3)
A0A100IH16	8444	6	1	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase
E2PSZ3	4726	2	1	IMP-specific 5'-nucleotidase 1 (EC 3.1.3.-)
A0A100IU80	8320	5	1	Inorganic diphosphatase
G3XMB9	3642	3	1	Ketoreductase azaE (EC 1.-.-.-) (Azaphilone biosynthesis cluster protein azaE)
A0A100I9T7	3660	3	1	Kinase-related protein

A0A100IB39	7093	3	1	Kynurenine aminotransferase
A0A100IPR3	7964	3	1	Lysosomal protective protein
A0A100IGU3	7653	2	1	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase
A0A117E128	3847	2	1	Metabolite transport protein
G3XLM4	6559	2	1	Methylenetetrahydrofolate reductase (EC 1.5.1.20)
A0A100IGC7	7893	5	1	Monothiol glutaredoxin-4
A0A117DY30	8155	2	1	mRNA splicing factor
A0A100INU6	7316	2	1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 64 kDa subunit
A0A117E493	7020	2	1	Nitrogen assimilation transcription factor NirA
G3Y421	7258	4	1	O-Mevalon transferase yanI (EC 2.-.-) (Yanuthone D synthesis protein I)
A0A100IJZ0	5235	3	1	Oxidoreductase
A0A100I9K6	8329	5	1	Peptide alpha-N-acetyltransferase Nat2
A0A100IL90	3425	1	1	Phosphatidylinositol 3-kinase Tor2
A0A100ILE0	4141	4	1	Phosphoglycerate mutase
A0A117DUZ4	5037	4	1	Phosphoserine phosphatase
A0A100IJ11	8488	2	1	Plasma membrane antiporter
A2RBC2	3468	2	1	Probable carboxypeptidase An18g06210 (EC 3.4.17.-) (Peptidase M20 domain-containing protein An18g06210)
A2RA98	3783	1	1	Protein kinase C (EC 2.7.11.13)
Q00078	4985	1	1	Protein kinase C-like (EC 2.7.11.13)
A0A117E2X4	3555	3	1	RNA-splicing protein MRS3
A0A100IUG1	7195	2	1	Ser/Thr protein phosphatase family
A0A117E3Q4	3197	4	1	SH3 domain protein
A0A100I2E9	4025	2	1	Siderophore biosynthesis protein
Q00179	4189	2	1	Signal recognition particle 54 kDa protein homolog
A2QJF4	6496	2	1	Signal recognition particle subunit SRP72
A0A124BV10	6349	4	1	Similar to An02g04850

A0A100IKI6	4801	6	1	Small nuclear ribonucleoprotein U2, A
A0A100II23	4026	5	1	Suppressor/enhancer of lin-12 protein 9
A0A100IK93	3143	1	1	Transporter mch1
A0A124BWL4	9366	5	1	tRNA methyltransferase subunit GCD14
A2QTW3	3550	13	1	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm2
A0A117DX56	3348	2	1	Ubiquitin fusion degradation protein UfdB
A0A100IGC5	9992	1	1	Uncharacterized protein
A0A100IRC0	4230	2	1	Uncharacterized protein
A0A100ITS4	4960	0	1	Uncharacterized protein
A0A117E225	7857	15	1	Uncharacterized protein
A2R2V5	3201	5	1	Uncharacterized protein
G3XTD1	6203	1	1	Uncharacterized protein
G3XU92	3368	2	1	Uncharacterized protein
G3XVP9	4660	2	1	Uncharacterized protein
G3XY19	9992	4	1	Uncharacterized protein
G3XZP8	4366	4	1	Uncharacterized protein
G3Y822	5546	14	1	Uncharacterized protein
G3YAF7	3379	8	1	Uncharacterized protein
G3YBM9	6027	1	1	Uncharacterized protein
G3YC04	8064	1	1	Uncharacterized protein
G3YC44	3337	1	1	Uncharacterized protein
G3YFP7	4386	5	1	Uncharacterized protein
G3YG83	3270	0	1	Uncharacterized protein
G3YHM6	3451	0	1	Uncharacterized protein
G3XVT5	4785	1	1	Uncharacterized protein (Fragment)
G3Y9V6	8329	10	1	Uncharacterized protein (Fragment)
G3YFM4	3535	1	1	Uncharacterized protein (Fragment)
A0A100I3G4	5317	4	1	Vacuolar protein sorting-associated protein 26

A0A100IHM8	3505	2	1	Vacuolar protein sorting-associated protein 29
A0A100ING1	4359	5	1	Vacuolar protein sorting-associated protein 74
A0A100IKX4	5523	6	1	Xanthine phosphoribosyltransferase 1

Tabela 2: Proteínas diferencialmente identificadas por espectrometria de massa do fungo *A.niger* VC em presença de íons Cu^{2+} (Uniprot, <http://www.uniprot.org>).

#Acesso	-10lgP	Convergencia (%)	#Peptídeos	Proteínas
G3XZT4	39087	46	25	Uncharacterized protein
D7GAW3	36317	57	17	Translation elongation factor 1-alpha (Fragment)
A0A100INN3	26592	36	14	14-3-3 protein
I7B155	25053	53	12	Calmodulin (Fragment)
A2R121	28732	39	11	Aspergillus niger contig An12c0380, genomic contig (EC 1.3.1.-)
A0A100IQ03	27053	35	10	NADH-ubiquinone oxidoreductase 39 kDa subunit
A2R8G7	26480	37	8	Aspergillus niger contig An16c0230, genomic contig (EC 1.1.1.100)
A5ABB4	21941	24	7	Aspergillus niger contig An08c0230, genomic contig (EC 1.1.1.91)
A0A100IPI0	17412	18	7	Heat shock protein 60
A0A100IU47	25347	25	7	Norsolorinic acid reductase
A0A124BW23	16998	14	6	Aminotransferase, classes I and II
A0A100IJG5	16692	18	5	Aflatoxin B1-aldehyde reductase GliO-like
A2Q8R5	17300	19	5	Aspergillus niger contig An01c0190, genomic contig
A2QYU0	17592	19	5	Aspergillus niger contig An12c0070, genomic contig (EC 1.3.1.-)
G3XVT2	21786	12	5	Uncharacterized protein
A2QCS1	18715	4	4	Aspergillus niger contig An02c0120, genomic contig
A2QLM3	14786	8	4	Aspergillus niger contig An06c0090, genomic contig
A2QN65	17996	13	4	Aspergillus niger contig An07c0110, genomic contig (EC 1.1.1.-)
A2QW33	17009	15	4	Aspergillus niger contig An11c0150, genomic contig (EC 1.1.1.195)
A0A117DYG4	14373	7	4	Eukaryotic translation initiation factor eIF-4A subunit, putative [Aspergillus flavus ATP-dependent RNA helicase FAL1 [Aspe
A0A100IAS4	22207	15	4	Uncharacterized protein
G3XUI1	16349	14	4	Uncharacterized protein
A0A100IMW8	12331	12	3	Aldo-keto reductase

A2QSY9	13478	14	3	Aspergillus niger contig An09c0020, genomic contig
A2R501	11315	7	3	Aspergillus niger contig An15c0100, genomic contig (EC 1.1.3.13)
A0A100IAW6	16037	9	3	Chitinase
A0A117E3H5	10345	6	3	EH domain binding protein epsin 2
G3XLZ5	13459	15	3	Uncharacterized protein (Fragment)
G3YGP4	9309	6	2	Aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3)
A2Q9J5	6576	2	2	Aspergillus niger contig An01c0290, genomic contig (EC 4.1.1.21)
A2QBX5	9255	15	2	Aspergillus niger contig An02c0010, genomic contig (EC 3.4.21.-)
A2QMN7	10199	8	2	Aspergillus niger contig An07c0070, genomic contig
A2QSI3	8992	6	2	Aspergillus niger contig An08c0280, genomic contig (EC 1.2.1.3)
A2QYU3	9242	6	2	Aspergillus niger contig An12c0070, genomic contig (EC 1.3.1.-)
A0A100IJ50	11196	1	2	Cell wall biogenesis protein phosphatase Ssd1
A0A117DX85	5277	10	2	Lectin family integral membrane protein
A0A100IFU7	9654	11	2	Ras family protein (Ras-related protein Rab-6A)
Q078W8	9654	11	2	Secretion related GTPase C
A0A100IFI2	6758	4	2	Translation initiation factor 4B
G3XP29	10868	3	2	Uncharacterized protein
G3Y355	10518	1	2	Uncharacterized protein (Fragment)
A0A117E3A2	6666	2	1	14-alpha sterol demethylase Cyp51B
A0A100ICS8	5832	0	1	1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase
A2Q7G2	5985	2	1	Aspergillus niger contig An01c0030, genomic contig
A2Q9K1	5071	3	1	Aspergillus niger contig An01c0290, genomic contig (EC 1.1.1.184)
A2QBD3	8046	6	1	Aspergillus niger contig An01c0470, genomic contig
A2QC57	4795	1	1	Aspergillus niger contig An02c0040, genomic contig (Fragment)
A2QES6	4827	3	1	Aspergillus niger contig An02c0390, genomic contig
A2QGA4	4585	4	1	Aspergillus niger contig An03c0070, genomic contig
A2QIK6	6057	3	1	Aspergillus niger contig An04c0140, genomic contig
A2QMJ4	8589	5	1	Aspergillus niger contig An07c0050, genomic contig (EC 2.5.1.18)

A2QMP0	4712	4	1	Aspergillus niger contig An07c0080, genomic contig
A2QMR9	4203	0	1	Aspergillus niger contig An07c0080, genomic contig
A2QQP7	3931	7	1	Aspergillus niger contig An08c0100, genomic contig
A2QT31	11510	3	1	Aspergillus niger contig An09c0030, genomic contig (EC 1.14.13.1)
A2QU00	4214	6	1	Aspergillus niger contig An09c0100, genomic contig
A2QUJ9	4227	3	1	Aspergillus niger contig An09c0180, genomic contig
A2QW14	5173	3	1	Aspergillus niger contig An11c0150, genomic contig
A2QY47	5938	9	1	Aspergillus niger contig An11c0400, genomic contig
A2QZJ8	6169	3	1	Aspergillus niger contig An12c0160, genomic contig
A2R113	5553	3	1	Aspergillus niger contig An12c0380, genomic contig (EC 1.-.-.-)
A2R162	7268	2	1	Aspergillus niger contig An13c0010, genomic contig (EC 1.14.14.-)
A2R2K2	9417	3	1	Aspergillus niger contig An14c0030, genomic contig (Fragment)
A2R2M7	6856	4	1	Aspergillus niger contig An14c0060, genomic contig (EC 1.-.-.-)
A2R359	4522	1	1	Aspergillus niger contig An14c0130, genomic contig
A2R447	6662	0	1	Aspergillus niger contig An14c0190, genomic contig (Fragment)
A2R455	7921	10	1	Aspergillus niger contig An14c0200, genomic contig
A2R4Z4	6067	0	1	Aspergillus niger contig An15c0100, genomic contig (EC 2.1.1.-)
A2R5T3	6381	3	1	Aspergillus niger contig An15c0190, genomic contig
A2RAX5	6911	1	1	Aspergillus niger contig An18c0160, genomic contig
A2RAX9	5496	1	1	Aspergillus niger contig An18c0160, genomic contig
A0A117E1A8	6650	3	1	BAR adaptor protein RVS167
A0A100I6D3	4228	0	1	Chitin synthase ChsE
A0A100IME7	7402	6	1	Citrate and oxoglutarate carrier protein (DNA replication protein YHM2)
G3Y702	4341	13	1	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit
G3XT55	4950	3	1	Dehydrogenase
A0A100IU38	4540	1	1	DNA-binding protein HGH1
A0A100IFR6	6580	5	1	DUF92 domain protein
A0A100I6B8	3970	1	1	Exocyst complex component Exo70

G3XWH2	3658	3	1	Ferulic acid decarboxylase 1 (EC 4.1.1.102) (Phenacrylate decarboxylase)
A0A100ITN0	58,85	2	1	Flavin-binding monooxygenase
Q5F4N6	6938	2	1	Flavohemoglobin
A0A100I3C3	5537	2	1	Glutathione transferase
A0A100IUZ3	6257	17	1	Import inner membrane translocase subunit TIM9 (Tim10/DDP family zinc finger family protein)
A0A124BY48	6108	1	1	LMBR1 domain protein
A0A117E0V4	4096	4	1	L-PSP endoribonuclease family protein
A0A100IJX6	3908	8	1	LSM domain family protein (Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2)
A0A124BW51	5762	9	1	LSM domain family protein (Small nuclear ribonucleoprotein SmD3)
A0A117E2F8	6766	1	1	MFS transporter
A0A100IMC6	4149	3	1	Mitochondrial fusion protein
P05328	5687	2	1	Multifunctional tryptophan biosynthesis protein [Includes: Anthranilate synthase component 2 (AS) (EC 4.1.3.27) (Anthranilate synthase, glutamine amidotransferase component); Indole-3-glycerol phosphate synthase (IGPS) (EC 4.1.1.48); N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase (PRAI) (EC 5.3.1.24)]
A0A100I973	10135	3	1	NADH oxidase
G3XZG5	3794	2	1	NADH:flavin oxidoreductase
G3XW35	3442	0	1	Non-ribosomal peptide synthetase
A0A100IL69	5865	5	1	Nuclear transport factor 2
A0A100IJE3	4125	1	1	Patched sphingolipid transporter
A0A100I3A5	7972	4	1	Phosphatidyl synthase
A0A100I3L3	3733	1	1	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase
A0A100ISL2	3763	0	1	Polyketide synthase
A0A100IQ55	4532	5	1	Seryl-tRNA synthetase
A0A117DZC7	4295	1	1	Similar to An15g02770
A0A124BZ28	3665	2	1	Sulfite reductase

A0A100IT00	4151	3	1	Tetratricopeptide repeat domain protein
A0A100I5N0	12061	3	1	Translation initiation factor eIF-2B subunit family protein
A2QP99	3486	3	1	Trehalose-6-phosphate synthase (EC 2.4.1.15) (UDP-glucose-glucosephosphate glucosyltransferase)
A0A100IR20	5157	6	1	TrkA-N domain dehydrogenase
A0A124BVK0	3456	0	1	tRNA processing endoribonuclease Trz1
A0A117DWN1	4953	6	1	Ubiquitin conjugating enzyme
A0A100I6G1	9169	1	1	Uncharacterized protein
A0A100IG69	6281	3	1	Uncharacterized protein
A0A100ILR8	5928	4	1	Uncharacterized protein
A0A100IQA7	11002	2	1	Uncharacterized protein
A0A100IUH7	4839	1	1	Uncharacterized protein
A2QR37	10225	6	1	Uncharacterized protein
G3XLR0	4443	3	1	Uncharacterized protein
G3XM24	5785	6	1	Uncharacterized protein
G3XMP2	5877	2	1	Uncharacterized protein
G3XRI8	5816	2	1	Uncharacterized protein
G3XTP0	5433	7	1	Uncharacterized protein
G3XW01	3764	4	1	Uncharacterized protein
G3XW65	4766	3	1	Uncharacterized protein
G3XWJ2	5252	2	1	Uncharacterized protein
G3XXU4	5476	0	1	Uncharacterized protein
G3Y528	5279	6	1	Uncharacterized protein
G3Y6V8	5121	4	1	Uncharacterized protein
G3Y7G1	4791	1	1	Uncharacterized protein
G3YCH9	6051	5	1	Uncharacterized protein
G3YDW1	5299	6	1	Uncharacterized protein
G3YFA3	3734	4	1	Uncharacterized protein

G3Y164	3598	2	1	Uncharacterized protein (Fragment)
G3Y2V8	5003	1	1	Uncharacterized protein (Fragment)
G3Y377	9939	2	1	Uncharacterized protein (Fragment)
G3Y8E7	5167	2	1	Uncharacterized protein (Fragment)
G3YG09	6732	2	1	Uncharacterized protein (Fragment)

ANEXO II

Proteínas diferencialmente expressas em

Rhizopus microsporus VC

Tabela 3: Proteínas diferencialmente identificadas por espectrometria de massa do fungo *Rhizopus microsporus* VC na ausência de íons Cu^{2+} (Uniprot, <http://www.uniprot.org>).

#Acesso	-10lgP	Convergência (%)	#Peptídeos	Proteínas
A0A1X0S6B0	33618	50	16	Rhizopuspepsin II
A0A1X0S6C4	30395	47	14	Extracellular aspartic proteinase
A0A0A1MR64	27333	12	14	Uncharacterized protein
A0A0C7C0F5	30723	29	12	Uncharacterized protein
A0A0A1N5Q1	21673	14	8	Uncharacterized protein
A0A1X0S5Y9	25394	29	7	Lipase
A0A0A1NIV8	21183	37	7	Putative V-type proton ATPase subunit B
A0A0C7BZ89	20125	16	7	Uncharacterized protein
A0A0A1N4T5	29814	21	7	Uncharacterized protein
A0A1X0RQ56	18045	17	6	Glucoamylase 1
A0A1X0RUE4	19543	11	6	Heme peroxidase
A0A0A1NRG7	24819	24	6	Putative Lipase preproprotein (Precursor)
A0A1X0SBM6	20831	9	5	Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase) (EC 4.2.1.-)
A0A0A1N6M5	17244	56	5	Uncharacterized protein
A0A0C7BRR1	17515	23	5	Uncharacterized protein
A0A1X0RXG9	20228	11	4	DAO-domain-containing protein
A0A0C7BD37	13821	10	4	Putative Glucoamylase
A0A0C7AX60	16443	9	4	Putative Lysine--tRNA ligase
A0A0C7AZS3	14726	16	4	Saccharopine dehydrogenase [NAD(+), L-lysine-forming] (SDH) (EC 1.5.1.7) (Lysine--2-oxoglutarate reductase)
A0A0C7BQQ3	16828	6	4	Uncharacterized protein
A0A0A1NK49	20228	11	4	Uncharacterized protein
A0A0C7CJW4	21393	26	4	Uncharacterized protein
A0A0A1NQ83	14486	22	4	Uncharacterized protein
A0A0A1NTV2	14565	14	4	Uncharacterized protein
A0A0C7B430	15726	11	3	Putative 40S ribosomal protein S6
A0A0A1MWZ8	15555	2	3	Putative Ura2 bifunctional carbamoylphosphate synthetase-aspartate transcarbamylase

A0A0C7B8I9	9925	10	3	Uncharacterized protein
A0A0A1MZB9	10839	7	3	Uncharacterized protein
A0A0C7CA95	12955	13	3	Uncharacterized protein
A0A0A1NJS1	16213	13	3	Uncharacterized protein
A0A0A1P0C6	17420	7	3	Uncharacterized protein
A0A0C7BUG5	16178	24	3	Uncharacterized protein
A0A0A1P7Q7	16275	12	3	Uncharacterized protein
A0A0C7BYC4	12324	3	2	Catalase (EC 1.11.1.6)
A0A1X0RT54	12324	3	2	Catalase (EC 1.11.1.6)
A0A1X0SF09	10194	3	2	Composite domain of metallo-dependent hydrolase
A0A0A1MTT9	12108	4	2	Homocitrate synthase, cytosolic isozyme (Putative Homocitrate synthase)
A0A1X0RWI1	11493	11	2	Metallo-dependent hydrolase
A0A1X0SCU7	16361	4	2	Polyadenylate-binding protein (PABP)
A0A0A1N283	12195	19	2	Putative 30S ribosomal protein S10e
A0A0A1N9Q0	8215	6	2	Putative Cell division control protein 48
A0A0A1NSK8	12108	4	2	Putative Homocitrate synthase
A0A0C7C9Z1	11947	9	2	Putative Rhizopuspepsin-1
A0A0C7B9S5	9382	4	2	Putative Saccharopine dehydrogenase
A0A0A1PJS7	14933	6	2	Ribosomal protein L19
A0A1X0RV51	7386	1	2	Sortilin
A0A0A1NQL8	8192	9	2	Uncharacterized protein
A0A1X0RVC5	8835	8	2	Saccharopine dehydrogenase [NAD(+), L-lysine-forming] (SDH) (EC 1.5.1.7) (Lysine--2-oxoglutarate reductase)
A0A0A1P2W7	9133	6	2	Uncharacterized protein
A0A0A1P6N2	12661	19	2	Uncharacterized protein
A0A0C7BE20	15919	8	2	Uncharacterized protein
A0A0A1NSA6	7479	10	2	Uncharacterized protein
A0A0C7AVG7	9160	13	2	Uncharacterized protein
A0A0C7BE71	9190	10	2	Uncharacterized protein
A0A0C7CHZ8	9205	6	2	Uncharacterized protein
A0A1X0S0H2	9259	2	2	Uncharacterized protein
A0A0A1PI69	10146	8	2	Uncharacterized protein
A0A0A1NKZ4	10256	10	2	Uncharacterized protein

A0A0C7BTT0	10557	5	2	Uncharacterized protein
A0A0C7CLF1	11915	8	2	Uncharacterized protein
A0A0A1P1S6	6055	2	1	3-isopropylmalate dehydratase (EC 4.2.1.33) (Alpha-IPM isomerase) (Isopropylmalate isomerase)
A0A0A1N0F5	7874	5	1	3-isopropylmalate dehydrogenase (EC 1.1.1.85)
A0A1X0RX31	7074	4	1	60S ribosomal protein L20
A0A0A1MVC6	5749	6	1	Acyl-CoA N-acyltransferase (Putative Diamine N-acetyltransferase)
A0A1X0S5L6	4644	1	1	ARM repeat-containing protein
A0A0C7BYX8	7506	1	1	Arylsulfatase (AS) (EC 3.1.6.1) (Aryl-sulfate sulphohydrolase)
A0A1X0RZH5	12502	1	1	DNA-directed RNA polymerase subunit (EC 2.7.7.6)
A0A1X0S4H3	9906	5	1	Class I glutamine amidotransferase-like protein
A0A0A1NC65	6662	9	1	Cytochrome b5 (Putative DNA damage response protein)
A0A0C7BMC5	12409	1	1	DNA-directed RNA polymerase subunit (EC 2.7.7.6)
A0A1X0RMA2	5664	0	1	DUF1744-domain-containing protein
A0A1X0SE05	6554	0	1	Dynein heavy chain
R9TFH8	10202	5	1	Elongation factor 1a (Fragment)
R9TID6	10202	5	1	Elongation factor 1-alpha (Fragment)
A0A1X0SFZ1	10154	3	1	FMN-linked oxidoreductase
A0A0A1N8S1	12687	9	1	GrpE protein homolog
A0A1X0S674	6220	2	1	HisG-domain-containing protein
A0A0A1MR01	7692	5	1	HSP20-like chaperone
A0A0A1N7S8	9778	4	1	Importin subunit alpha
A0A1X0RQM0	6665	1	1	L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase
A0A1X0S9G4	5935	4	1	Peptidase M22, glycoprotease
A0A0C7B012	6587	4	1	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase (EC 2.5.1.54) (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase) (DAHP synthase) (Phospho-2-keto-3-deoxyheptonate aldolase)
A0A0A1MZW9	4362	3	1	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase (Putative Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase)
A0A1X0RK01	6433	2	1	p-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase protein
A0A0A1PA24	7002	7	1	PRTase-like protein (Putative Uracil phosphoribosyltransferase 1)
A0A0A1NRY1	6203	4	1	Purine nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.1) (Inosine-guanosine phosphorylase)
A0A0C7CND5	4317	4	1	Putative Acyl-CoA dehydrogenase

A0A0A1NED8	4310	2	1	Putative Ade16p
A0A0C7AW58	4520	3	1	Putative Alanine-glyoxylate transaminase/(R)-3-amino-2-methylpropionate-pyruvate transaminase
A0A0A1P9W1	5740	1	1	Putative Aminoadipate reductase
A0A0A1NR83	6220	4	1	Putative ATP phosphoribosyltransferase
A0A0A1N4G5	6433	2	1	Putative ATPase
A0A0C7C594	5565	9	1	Putative ATP-dependent RNA helicase uap56
A0A0A1MVX3	5687	13	1	Putative Conidiation-specific protein 10
A0A0A1N4T4	6380	9	1	Putative Coronin
A0A0A1NXU4	8898	7	1	Putative Cytosolic nonspecific dipeptidase
A0A0C7B2P4	5749	6	1	Putative Diamine N-acetyltransferase
A0A0C7BDR3	6128	0	1	Putative DNA polymerase
A0A0A1P5J0	12409	1	1	Putative DNA-directed RNA polymerase
A0A0C7BGP9	4738	0	1	Putative Dynein heavy chain
A0A0C7BXZ7	4985	16	1	Putative Farnesyl pyrophosphate synthase
A0A0A1N6T3	5881	7	1	Putative G2/M transition checkpoint protein Sum2
A0A0C7AZK7	5644	8	1	Putative Glucose 1-dehydrogenase
A0A0C7BP47	4871	3	1	Putative Glucose repression regulatory protein TUP1
A0A0A1N8J8	5139	5	1	Putative Glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase
A0A0C7B2D1	11391	6	1	Putative Histone H1/5
A0A0A1N738	5781	5	1	Putative Isocitrate dehydrogenase, NAD-dependent
A0A0C7B7V9	6275	1	1	Putative L-aminoacidipate-semialdehyde dehydrogenase
A0A0A1P7D8	12643	11	1	Putative Lipase
A0A0C7BS47	8392	4	1	Putative Monothiol glutaredoxin
A0A0C7CC08	5587	8	1	Putative Myo-inositol-1-phosphate synthase
A0A0C7B014	7032	3	1	Putative NMT-1 like protein
A0A0C7BYD5	5901	0	1	Putative Osmolarity two-component system, response regulator SSK1
A0A0C7AZV5	6587	5	1	Putative Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase
A0A0A1N203	4362	3	1	Putative Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase
A0A0C7C1S7	4310	1	1	Putative Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase
A0A0A1P926	7426	4	1	Putative Pyruvate dehydrogenase complex dihydrolipoamide acetyltransferase
A0A0C7CN07	6052	7	1	Putative Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial

A0A0A1P1H5	3743	7	1	Putative Rho family, other
A0A0C7CP68	5900	6	1	Putative Saccharopine dehydrogenase [NAD(), L-lysine-forming]
A0A0C7CKU8	5612	10	1	Putative Single-stranded DNA-binding protein
A0A0C7CNP8	4040	6	1	Putative Small nuclear ribonucleoprotein
A0A0A1NCE3	7523	9	1	Putative Small nuclear ribonucleoprotein D3 (Sm-like ribonucleo protein)
A0A0C7AYK8	7523	8	1	Putative Sm-like ribonucleo protein
A0A0A1P305	3938	2	1	Putative Tif5p
A0A0A1N9L6	7002	7	1	Putative Uracil phosphoribosyltransferase 1
A0A0A1P346	4310	2	1	Putative ZYRO0A09130p
A0A1X0S7H8	3793	5	1	Ras protein
A0A1X0S7C6	8319	6	1	Ras-domain-containing protein
A0A1X0SGT8	7522	7	1	Redoxin
A0A0C7CK72	4611	2	1	Reticulon-like protein
A0A1X0S6T9	5937	2	1	Saccharopine dehydrogenase
A0A1X0S7S1	9830	1	1	Sec7-domain-containing protein
A0A0C7CN13	4720	2	1	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial (EC 1.3.5.1)
A0A1X0S380	13297	2	1	T-complex protein 1 zeta subunit
A0A1X0RLN8	6615	4	1	TMP-TENI-domain-containing protein
A0A0A1PF76	4853	2	1	Trehalase (EC 3.2.1.28) (Alpha-trehalose glucohydrolase)
A0A0A1N7Z6	5935	3	1	tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase, mitochondrial (EC 2.3.1.234) (N6-L-threonylcarbamoyladenine synthase) (t(6)A synthase) (t(6)A37 threonylcarbamoyladenine biosynthesis protein) (tRNA threonylcarbamoyladenine biosynthesis protein)
A0A1X0SAG2	4040	6	1	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm7
A0A1X0S459	6274	1	1	UDP-Glycosyltransferase/glycogen phosphorylase
A0A0A1NKM0	4004	1	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BXG7	4143	5	1	Uncharacterized protein
A0A0A1N111	4169	2	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NRF5	4250	2	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BXI4	4316	4	1	Uncharacterized protein
A0A0C7B9Q0	4496	2	1	Uncharacterized protein
A0A0C7AX08	4507	1	1	Uncharacterized protein

A0A1X0RWL4	4576	1	1	Uncharacterized protein
A0A0C7CIG1	4631	6	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NT69	4699	4	1	Uncharacterized protein
A0A1X0S3F0	4733	2	1	Uncharacterized protein
A0A0A1P013	4835	5	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NX83	5022	3	1	Uncharacterized protein
A0A0A1P8F9	5256	9	1	Uncharacterized protein
A0A0C7AWX7	5261	0	1	Uncharacterized protein
A0A0A1P8J2	5562	3	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NR64	5867	7	1	Uncharacterized protein
A0A0C7AVU2	5909	1	1	Uncharacterized protein
A0A0C7B0E6	5918	2	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BHX9	6140	0	1	Uncharacterized protein
A0A0C7CCY7	6162	10	1	Uncharacterized protein
A0A0A1N571	6274	1	1	Uncharacterized protein
A0A0C7CFG3	6615	5	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NLP1	6713	5	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BBB9	6855	2	1	Uncharacterized protein
A0A0C7B3Q7	6909	3	1	Uncharacterized protein
A0A0C7CG27	6927	1	1	Uncharacterized protein
A0A0A1PJY9	7102	5	1	Uncharacterized protein
A0A0A1PHW0	7128	3	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NZR1	7663	1	1	Uncharacterized protein
A0A0C7B8U9	7692	5	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BS85	7726	6	1	Uncharacterized protein
A0A0C7CAC3	8099	1	1	Uncharacterized protein
A0A0A1P093	8276	15	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BJP2	8361	5	1	Uncharacterized protein
A0A0C7B607	8447	7	1	Uncharacterized protein
A0A0A1N605	8479	14	1	Uncharacterized protein
A0A0C7CEW3	8609	3	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BXX1	8693	9	1	Uncharacterized protein
A0A0A1P4S7	8916	12	1	Uncharacterized protein

A0A0C7BUB7	9129	19	1	Uncharacterized protein
A0A1X0S9S0	9164	24	1	Uncharacterized protein
A0A0C7CBQ3	9208	5	1	Uncharacterized protein
A0A0C7B2L9	9407	2	1	Uncharacterized protein
A0A0A1PKX7	10416	1	1	Uncharacterized protein
A0A0A1MYV4	3759	1	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BDB4	3825	1	1	Uncharacterized protein
A0A1X0SGS1	3874	1	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BK21	3970	3	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NYA3	3973	6	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BGA3	3981	0	1	Uncharacterized protein
A0A0C7CLB0	3998	13	1	Uncharacterized protein
A0A0A1P2C3	4003	2	1	Uncharacterized protein
A0A0C7AWD2	4258	5	1	Uncharacterized protein
A0A0A1MP00	4316	1	1	Uncharacterized protein
A0A0C7C5E2	4514	2	1	Uncharacterized protein
A0A1X0RP42	4584	1	1	Uncharacterized protein
A0A0A1P6X1	4598	5	1	Uncharacterized protein
A0A0C7B7H7	4612	18	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BRJ8	4644	1	1	Uncharacterized protein
A0A0A1P0L9	4740	4	1	Uncharacterized protein
A0A0C7CBX4	4765	7	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BIF7	4908	2	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NBY6	4923	5	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BF35	4961	7	1	Uncharacterized protein
A0A0A1PK59	4971	1	1	Uncharacterized protein
A0A0A1N1Z7	4992	3	1	Uncharacterized protein
A0A1X0RYN4	5144	1	1	Alpha-mannosidase (EC 3.2.1.-)
A0A0C7C7V8	5174	1	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BD06	5618	8	1	Uncharacterized protein
A0A1X0RZ65	5687	9	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NAN5	5744	3	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BE81	5808	1	1	Uncharacterized protein

A0A0A1NSR6	6322	3	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BU81	6618	7	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NPI3	6676	2	1	Uncharacterized protein
A0A1X0SC01	7116	2	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NDQ7	7237	4	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BV03	7850	4	1	Uncharacterized protein
A0A0A1MQ36	7959	1	1	Uncharacterized protein
A0A0C7C161	8341	1	1	Uncharacterized protein
A0A0C7B4X7	8371	1	1	Uncharacterized protein
A0A0C7AVZ1	8617	2	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BNJ2	9830	1	1	Uncharacterized protein
A0A1X0S1W9	11862	0	1	Uncharacterized protein
A0A0C7AWK5	12007	0	1	Uncharacterized protein
A0A0A1P041	13228	5	1	Uncharacterized protein

Tabela 4: Proteínas diferencialmente identificadas por espectrometria de massa do fungo *R. microsporus* VC na presença de íons Cu^{2+} (Uniprot, <http://www.uniprot.org>).

# Acesso	-10lgP	Convergência (%)	#Peptídeos	Proteínas
A0A0A1NWB8	41161	58	30	Putative Heat shock protein 70
A0A1X0RYW6	34513	50	18	Uncharacterized protein (Fragment)
A0A0C7CL20	33057	24	15	Putative Transketolase
A0A0C7BZS8	34501	25	12	Uncharacterized protein
A0A1X0RNB3	19422	16	11	NAD-specific glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.2)
A0A0C7BPW7	25188	29	10	Uncharacterized protein
A0A0C7AW47	31445	31	10	Uncharacterized protein
A0A0A1NFH3	22613	19	9	Uncharacterized protein
A0A1X0SB54	27024	28	8	40S ribosomal protein S6
A0A1X0S2U0	23839	12	8	ATP-dependent 6-phosphofructokinase (ATP-PFK) (Phosphofructokinase) (EC 2.7.1.11) (Phosphohexokinase)
A0A0C7B4Q9	26118	44	8	Putative Ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome c1 subunit
A0A0A1N987	19292	13	8	Uncharacterized protein
A0A1X0RKG4	20849	8	8	Uncharacterized protein (Fragment)
A0A0A1P1D1	20202	44	7	Putative 30S ribosomal protein S10e
A0A0C7B3N0	15531	7	7	Uncharacterized protein
A0A0A1N1K5	19300	13	7	Uncharacterized protein
A0A0C7B5L2	19694	26	7	Uncharacterized protein
A0A1X0S364	24767	32	7	Ribosomal protein L19
A0A0C7AVD8	21815	28	6	Ribosomal protein L19
A0A0C7BHR4	13239	13	6	Uncharacterized protein
A0A0C7BEF8	16996	13	6	Uncharacterized protein
A0A1X0RS99	17016	13	6	Uncharacterized protein
A0A0C7AY27	17460	9	6	Uncharacterized protein

A0A0A1P7K7	21163	29	6	Uncharacterized protein
A0A0C7B9R4	21910	47	6	Uncharacterized protein
A0A1X0RLE1	16695	7	5	Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase) (EC 4.2.1.-)
A0A0A1NVK4	15966	15	5	Calreticulin
A0A0A1MJ23	14411	17	5	Putative Mitochondrial DNA replication protein YHM2
A0A1X0RQZ1	14566	12	5	T-complex protein 1 subunit epsilon
A0A0C7AY20	13476	24	5	Uncharacterized protein
A0A0C7AWA2	14151	14	5	Uncharacterized protein
A0A0A1PHU6	15966	15	5	Uncharacterized protein
A0A0C7B2C5	16097	51	5	Uncharacterized protein
A0A0C7BAK3	17058	15	5	Uncharacterized protein
A0A0C7B6Q3	18195	26	5	Uncharacterized protein
A0A0C7B9W7	22964	36	5	Uncharacterized protein
A0A0A1NZW7	11551	50	5	V-type proton ATPase subunit G
A0A0A1P8Z0	16929	6	4	Arginyl-tRNA synthetase
A0A0A1NAC2	20073	11	4	Fructose-bisphosphate aldolase, class II (Putative Fructose 1,6-bisphosphate aldolase)
A0A1X0RZI5	16136	9	4	Serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)
A0A1X0S7G1	14059	14	4	Oxysterol-binding protein
A0A0A1PJB8	12271	23	4	Putative Ras-like protein Rab-8A (Putative SEC4-like Rab/GTPase)
A0A0A1MNA1	12339	9	4	Putative Ribosome biosynthesis protein SIK1
A0A0C7BJ98	12339	9	4	Putative ZYBA0S10-02674g1_1
A0A1X0RWG6	15106	18	4	Ras-domain-containing protein
A0A0C7C6G3	9338	20	4	Uncharacterized protein
A0A0A1NA88	10563	14	4	Uncharacterized protein
A0A0C7B9C5	11051	7	4	Uncharacterized protein
A0A0A1P250	18046	14	4	Uncharacterized protein
A0A0C7BA84	22181	24	4	Uncharacterized protein

A0A1X0RUE0	9525	5	3	3-isopropylmalate dehydratase (EC 4.2.1.33) (Alpha-IPM isomerase) (Isopropylmalate isomerase)
A0A0C7BI12	12571	8	3	Acyl-CoA desaturase (EC 1.14.19.1)
A0A1X0RNX9	9081	13	3	D subunit of V-type ATPase
A0A0A1NCA3	16767	20	3	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I (eIF3i) (Eukaryotic translation initiation factor 3 39 kDa subunit homolog) (eIF-3 39 kDa subunit homolog)
A0A0C7BQ70	11760	4	3	Glycogen [starch] synthase (EC 2.4.1.11)
A0A0C7BNR4	10816	11	3	NADH-cytochrome b5 reductase (EC 1.6.2.2)
A0A0C7BLI3	12810	11	3	Putative 3-phosphoglycerate dehydrogenase
A0A0A1NY01	9464	10	3	Putative Acetyl-CoA hydrolase/transferase
A0A0C7BLV8	10472	9	3	Putative Lanosterol 14-alpha demethylase
A0A0A1P2Q1	12810	11	3	Putative Ser3p
A0A0C7BNX1	9208	5	3	Putative Trehalose-6-phosphate synthase
A0A0C7BJ15	9081	13	3	Putative V-type proton ATPase subunit D
A0A1X0SA92	11361	7	3	T-complex protein 1 subunit alpha
A0A0C7BSP5	8291	11	3	Uncharacterized protein
A0A1X0SC14	9208	5	3	Uncharacterized protein
A0A0C7AYA2	10004	13	3	Uncharacterized protein
A0A0C7AW64	10931	25	3	Uncharacterized protein
A0A0A1NL10	12258	7	3	Uncharacterized protein
A0A0A1MNS5	12304	10	3	Uncharacterized protein
A0A0C7B409	12960	8	3	Uncharacterized protein
A0A0C7BPE6	14146	9	3	Uncharacterized protein
A0A0A1PDR2	6946	6	2	26S protease regulatory subunit 10B (Putative 26S protease regulatory subunit S10B)
A0A0A1PFV3	11254	13	2	6-phosphogluconolactonase (Putative 6-phosphogluconolactonase)
A0A0A1NVW8	9790	18	2	Acyl-CoA N-acyltransferase (Putative Glucosamine-phosphate N-acetyltransferase)

A0A1X0SDV8	6497	7	2	ATPase GET3 (EC 3.6.-.-) (Arsenical pump-driving ATPase) (Arsenite-stimulated ATPase) (Golgi to ER traffic protein 3) (Guided entry of tail-anchored proteins 3)
A0A0C7BAZ3	9054	10	2	Chorismate synthase (EC 4.2.3.5)
A0A1X0S1G3	7704	2	2	Coatomer subunit beta'
A0A1X0SCV3	7090	3	2	Coatomer subunit gamma
A0A1X0S4I1	8428	27	2	Cytochrome b5
A0A1X0RQT6	9498	4	2	Cytochrome P450
A0A0C7AY72	8606	5	2	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 (EC 2.4.99.18)
A0A0C7B787	10425	18	2	E3 ubiquitin ligase complex SCF subunit sconC (Putative E3 ubiquitin ligase complex SCF subunit sconC)
A0A0A1MPZ9	9692	6	2	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J (eIF3j) (Eukaryotic translation initiation factor 3 30 kDa subunit homolog) (eIF-3 30 kDa subunit homolog)
A0A1X0S2D3	9186	8	2	NADH-cytochrome b5 reductase (EC 1.6.2.2)
A0A1X0SDV7	8203	7	2	Glycoside hydrolase/deacetylase
A0A1X0RL43	11698	3	2	Heat shock protein Hsp90
A0A0C7B4S8	5246	7	2	Methylthioribose-1-phosphate isomerase (M1Pi) (MTR-1-P isomerase) (EC 5.3.1.23) (S-methyl-5-thioribose-1-phosphate isomerase) (Translation initiation factor eIF-2B subunit alpha/beta/delta-like protein)
A0A1X0S5T3	8296	2	2	Multi drug resistance-associated protein MRP
A0A1X0SBG0	7813	9	2	NIPSNAP-domain-containing protein
A0A0A1MLR0	6794	5	2	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase (EC 2.5.1.54) (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase) (DAHPSynthase) (Phospho-2-keto-3-deoxyheptonate aldolase)
A0A0A1NMN2	8817	16	2	Proteasome subunit beta type (EC 3.4.25.1)
A0A1X0RS84	8817	15	2	Proteasome subunit beta type (EC 3.4.25.1)
A0A1X0RN15	11928	5	2	Protein serine/threonine phosphatase 2C

A0A0A1NAZ6	11421	12	2	Protein YOP1
A0A0A1NHW8	7272	11	2	Purine and uridine phosphorylase
A0A0C7B4A7	9935	6	2	Putative 26s protease regulatory subunit 4
A0A0C7CDL6	10935	8	2	Putative 40S ribosomal protein S12
A0A0A1P7B5	13144	10	2	Putative Actin-like protein 2
A0A0C7BBT2	9515	6	2	Putative Acyl-CoA carboxylate CoA-transferase
A0A0A1P307	9036	6	2	Putative Aldehyde dehydrogenase (NAD)
A0A0A1P841	9130	2	2	Putative Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase (S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase)
A0A0A1NUZ7	6319	24	2	Putative DUTP pyrophosphatase
A0A0C7BYK4	9790	18	2	Putative Glucosamine-phosphate N-acetyltransferase
A0A0A1NUF7	8891	2	2	Putative Isoleucine-tRNA ligase
A0A0C7AWL3	10175	7	2	Putative N-ethylmaleimide reductase
A0A0C7BER9	9345	3	2	Putative Phosphoribosylformylglycinamide synthase
A0A0C7BB61	7697	7	2	Putative Pre-mRNA-processing factor 19
A0A1X0S7L7	9935	6	2	Putative RPT2-26S proteasome regulatory subunit
A0A0A1N8S8	11390	5	2	Putative Serine-tRNA ligase (Seryl-tRNA synthetase)
A0A0A1MUB7	11129	5	2	Putative Seryl-trna synthetase
A0A0A1P596	7673	17	2	Putative Sorting nexin-3
A0A0C7BHS6	10936	4	2	Putative SPX domain containing protein
A0A0C7B5C8	7234	12	2	Putative Translation initiation factor 2 subunit 2
A0A0C7BQE4	9656	9	2	Putative Vacuolar protein sorting-associated protein 26B
A0A0C7B1X8	8974	12	2	Putative Vesicle-associated membrane protein 7
A0A0A1NGY3	7740	11	2	Putative V-type ATPase, D subunit
A0A1X0S8S2	11893	13	2	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial (EC 1.10.2.2)
A0A1X0SC27	8974	18	2	Synaptobrevin-domain-containing protein

A0A1X0RSV7	5744	10	2	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G (eIF3g) (Eukaryotic translation initiation factor 3 RNA-binding subunit) (eIF-3 RNA-binding subunit) (Translation initiation factor eIF3 p33 subunit homolog) (eIF3 p33 homolog)
A0A0A1PL34	6501	47	2	Tubulin-specific chaperone A
A0A0A1MVE0	11457	9	2	Tyrosine--tRNA ligase (EC 6.1.1.1) (Tyrosyl-tRNA synthetase)
A0A0C7BA65	6922	10	2	Uncharacterized protein
A0A1X0RJT1	7008	11	2	Uncharacterized protein
A0A0C7C5Z7	7173	7	2	Uncharacterized protein
A0A0C7BSG0	7346	5	2	Uncharacterized protein
A0A0C7B680	7701	2	2	Uncharacterized protein
A0A0C7B0P8	7813	8	2	Uncharacterized protein
A0A0C7CPS8	7813	11	2	Uncharacterized protein
A0A0C7BGR6	8203	6	2	Uncharacterized protein
A0A0C7BSU1	8232	35	2	Uncharacterized protein
A0A0A1N9Z4	8836	9	2	Uncharacterized protein
A0A0A1N9B4	9052	14	2	Uncharacterized protein
A0A0A1NBN1	9096	39	2	Uncharacterized protein
A0A0C7B6Y1	9250	5	2	Uncharacterized protein
A0A0C7C0M8	9619	5	2	Uncharacterized protein
A0A0C7AX81	9703	11	2	Uncharacterized protein
A0A0C7AW88	9895	5	2	Uncharacterized protein
A0A0C7B8K4	10821	5	2	Uncharacterized protein
A0A1X0RNK7	10936	2	2	Uncharacterized protein
A0A0A1P438	11200	5	2	Uncharacterized protein
A0A0A1MLZ0	11257	9	2	Uncharacterized protein
A0A0C7BK97	11389	11	2	Uncharacterized protein
A0A1X0SBZ4	11485	3	2	Uncharacterized protein
A0A0C7BQT3	11489	11	2	Uncharacterized protein

A0A0A1P030	11611	6	2	Uncharacterized protein
A0A0C7BVM2	11625	16	2	Uncharacterized protein
A0A0C7BDX0	11698	3	2	Uncharacterized protein
A0A0C7BIJ2	12051	19	2	Uncharacterized protein
A0A0C7B537	12235	5	2	Uncharacterized protein
A0A0C7C2A0	12806	28	2	Uncharacterized protein
A0A1X0S585	13830	4	2	Malic enzyme
A0A0C7BHM5	14950	9	2	Uncharacterized protein
A0A1X0RVD2	17468	16	2	Uncharacterized protein
A0A1X0SD88	5813	4	1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14
A0A0A1NWW2	10718	14	1	30S ribosomal protein S8 (Putative 30S ribosomal protein S8)
A0A0C7BMG3	5402	18	1	40S ribosomal protein S29 (Putative 40S ribosomal protein S29-B)
A0A1X0RV53	3870	17	1	40S ribosomal protein S30
A0A0A1N4A8	8363	11	1	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase (DMRL synthase) (EC 2.5.1.78)
A0A1X0SAW6	4333	3	1	6PF2K-domain-containing protein
A0A1X0SFS8	5537	2	1	Acetyl-CoA hydrolase
A0A1X0RZ64	4369	2	1	Acid protease
A0A1X0RJS5	4282	3	1	Alpha/beta-hydrolase
A0A1X0S4S7	3607	3	1	Ammonium transporter
A0A0A1N088	4808	1	1	ANTH-domain-containing protein (Putative SLA2 homologue)
A0A1X0SFH5	6497	2	1	Asparaginyl-tRNA synthetase
A0A1X0RX01	7174	2	1	ATP-dependent metallopeptidase Hfl
A0A0A1N1T5	7935	3	1	Catalase (EC 1.11.1.6)
A0A0C7C1S4	7903	4	1	Cell division/GTP binding protein (Putative GTP binding protein)
A0A1X0S7M9	4217	1	1	Chitin synthase
A0A1X0S1U3	6630	14	1	ClpS-like protein
A0A1X0RQP9	5498	6	1	Cytidine deaminase (EC 3.5.4.5) (Cytidine aminohydrolase)

A0A0A1P3G3	7031	4	1	Diphosphomevalonate decarboxylase (EC 4.1.1.33) (Mevalonate pyrophosphate decarboxylase)
A0A1X0S643	7116	3	1	DnaJ-domain-containing protein
A0A1X0S5S7	5458	6	1	Dolichol-phosphate mannosyltransferase
A0A1X0S966	10130	7	1	E set domain-containing protein
A0A0A1NVG8	5282	6	1	ERG2 and sigma1 receptor-like protein
A0A0C7BH34	6236	2	1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A (eIF3a) (Eukaryotic translation initiation factor 3 110 kDa subunit homolog) (eIF3 p110) (Translation initiation factor eIF3, p110 subunit homolog)
A0A0C7BWI1	8688	2	1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D (eIF3d)
A0A0C7BKN5	5505	3	1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M (eIF3m)
A0A1X0RKP9	3768	3	1	Eukaryotic translation initiation factor 4E
A0A0A1P2U2	6138	4	1	FMN-linked oxidoreductase
A0A1X0RZL8	5895	1	1	Glycogen [starch] synthase (EC 2.4.1.11)
A0A0A1ML18	5947	1	1	Glycoside hydrolase
A0A0A1P1N5	13605	4	1	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein (Putative Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1)
A0A1X0S4M6	6146	5	1	Histone H2A
A0A0C7AZS1	8680	1	1	Kinesin-like protein
A0A0C7C4D0	4909	2	1	Leukotriene A(4) hydrolase (LTA-4 hydrolase) (EC 3.3.2.6)
A0A1X0S1F7	4909	2	1	Leukotriene A(4) hydrolase (LTA-4 hydrolase) (EC 3.3.2.6)
A0A1X0RMP7	3473	5	1	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase
A0A0A1NVS8	3734	2	1	Methionine aminopeptidase 2 (MAP 2) (MetAP 2) (EC 3.4.11.18) (Peptidase M)
A0A0C7BK67	3789	7	1	Mitochondrial pyruvate carrier
A0A0A1N9G2	7985	12	1	mRNA stability protein
A0A1X0RRI4	9582	3	1	NADPH:quinone reductase
A0A1X0RTZ3	5371	3	1	NAP-domain-containing protein

A0A1X0S9Y0	6024	2	1	NTF2-domain-containing protein
A0A1X0RWB6	3468	2	1	Phosphoribosylamine--glycine ligase
A0A1X0S6C1	7026	1	1	Phosphorylase kinase alphabeta
A0A0A1PLE2	5693	10	1	Prefoldin
A0A0A1P4Z3	7440	5	1	Proliferating cell nuclear antigen
A0A0C7BRC5	6422	2	1	Proline dehydrogenase (EC 1.5.5.2)
A0A0A1P6I3	3869	4	1	Proteasome subunit beta type (EC 3.4.25.1)
A0A1X0RL44	3869	5	1	Proteasome subunit beta type (EC 3.4.25.1)
A0A1X0SFT3	6199	3	1	Protein phosphatase PP2A regulatory subunit B
A0A0C7B6P6	6199	3	1	Protein phosphatase PP2A regulatory subunit B
A0A0C7BJH3	9025	5	1	Putative 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
A0A0C7BAP4	6630	14	1	Putative 50S ribosomal protein L7/L12
A0A0C7B1T2	4724	3	1	Putative Actin Cyl
A0A0A1NPA5	8085	2	1	Putative AFG3 family protein
A0A0A1NAJ7	5899	1	1	Putative Alpha 1,3-glucosidase
A0A0C7BS65	3468	2	1	Putative Aminoimidazole ribonucleotide synthetase
A0A0A1NKD6	8449	3	1	Putative Argininosuccinate synthase
A0A0C7B5Y1	4409	3	1	Putative Aspartate-semialdehyde dehydrogenase
A0A0A1NLT1	5282	6	1	Putative C-8 sterol isomerase
A0A0A1MN65	7903	5	1	Putative CDC10
A0A0A1PGZ4	6774	6	1	Putative Cell division control protein 12 (Septin)
A0A0C7BAC5	8085	2	1	Putative Cell division protease ftsH
A0A0A1PBW3	5319	2	1	Putative Centromere/microtubule-binding protein cbf5
A0A0A1NIF4	7557	11	1	Putative Conidiation-specific protein con-10 (Putative Stress-induced bacterial acidophilic repeat domain-containing protein)
A0A0C7AWU6	3926	6	1	Putative DUF866 domain-containing protein
A0A0C7BB32	4975	2	1	Putative Elongation factor Tu GTP binding domain-containing protein
A0A0A1MUH8	5106	6	1	Putative Enoyl reductase
A0A0C7C655	4975	2	1	Putative Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit

A0A0A1MI44	4975	4	1	Putative Eukaryotic release factor 3
A0A0C7BPJ2	5092	5	1	Putative Expressed protein
A0A0A1NNW7	6211	9	1	Putative F-actin-capping protein subunit beta isoforms 1 and 2
A0A0A1N7Q3	9269	5	1	Putative Farnesyl pyrophosphate synthase
A0A0A1PBA2	6199	2	1	Putative GTP cyclohydrolase II
A0A0C7BLY5	6608	2	1	Putative Heat shock protein 78, mitochondrial
A0A0C7B1S0	11013	8	1	Putative Histone H1/5
A0A0A1P7A1	5129	2	1	Putative Hydroxysteroid dehydrogenase
A0A0C7BU29	8449	3	1	Putative KLTH0F06644p
A0A0C7BSA5	3521	8	1	Putative Maltose O-acetyltransferase
A0A0C7CCB8	9416	5	1	Putative Metacaspase-1A
A0A0C7BI60	4581	4	1	Putative Mitochondrial inner membrane transporter
A0A0C7AXE0	5129	1	1	Putative Multifunctional beta-oxidation protein
A0A0C7AVN4	4499	4	1	Putative NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 4
A0A0A1NXG3	4970	13	1	Putative Ndufs5 domain-containing protein
A0A0C7BQ12	4053	2	1	Putative Non-specific lipid-transfer protein
A0A0C7BAH8	5371	3	1	Putative Nucleosome assembly protein 1-like 1
A0A0C7BQ23	3530	6	1	Putative Peanut-like protein 1 (Cell division control like protein 1)
A0A0C7B215	7335	4	1	Putative Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain
A0A0C7BS17	3468	2	1	Putative Phosphoribosylamine-glycine ligase / phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase
A0A0C7CAF8	6199	2	1	Putative Podospora anserina S mat genomic DNA chromosome 2, supercontig 2
A0A0C7BSB7	4653	3	1	Putative Pre-mRNA-splicing factor syf1
A0A0A1NC25	8717	15	1	Putative Proteasome subunit alpha type
A0A0C7CAU0	6199	2	1	Putative Riboflavin biosynthesis protein
A0A0A1N4D2	7417	19	1	Putative Ribonucleoprotein-associated protein (Ribonucleo protein- associated protein)

A0A0A1NLK0	6392	5	1	Putative RNA-binding domain-containing protein
A0A0A1NZR5	3530	2	1	Putative Sep5a
A0A0A1NWR0	5129	2	1	Putative Short-chain dehydrogenase/reductase SDR
A0A0C7CFD8	6826	2	1	Putative Signal recognition particle subunit SRP72
A0A0C7B6K0	3955	11	1	Putative Single-stranded DNA-binding protein
A0A0C7BX09	4808	1	1	Putative SLA2 homologue
A0A0A1NNX6	4375	9	1	Putative Small secreted protein, hesp-767
A0A0C7CC84	5455	3	1	Putative S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase
A0A0C7C872	9826	3	1	Putative SNF7 family protein, charged multivesicular body protein 2A
A0A0C7B5U5	3467	1	1	Putative SSD1
A0A0A1NJ40	4053	2	1	Putative Sterol carrier protein 2
A0A0C7CIW0	5980	2	1	Putative Succinate semialdehyde dehydrogenase
A0A0A1NTX2	5582	2	1	Putative T-complex protein 1 subunit theta
A0A0C7C8E6	4431	4	1	Putative Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic
A0A0C7AZP1	3887	4	1	Putative UDP-glucose 4-epimerase
A0A0C7C802	4004	10	1	Putative UDP-glucuronate decarboxylase
A0A0C7BFW8	5288	5	1	Putative Uridine kinase
A0A0A1N3F3	4363	5	1	Putative Vesicle transporter SEC22
A0A0C7B9Z9	8085	2	1	Putative YALI0A10615p
A0A0C7BTH8	11239	4	1	Putative YALI0D03762p
A0A0A1NPR4	7167	3	1	Reticulon-like protein
A0A1X0RQH6	4262	2	1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 (EC 2.4.99.18)
A0A1X0S824	8985	5	1	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase
A0A1X0S583	3530	2	1	Septin
A0A0C7BPM4	5455	3	1	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase (EC 2.4.2.28) (5'-methylthioadenosine phosphorylase) (MTA phosphorylase) (MTAP) (MTAPase)

A0A1X0RR53	4363	5	1	Snare-like protein
A0A0C7BCL3	4573	8	1	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha, mitochondrial (EC 6.2.1.5) (Succinyl-CoA synthetase subunit alpha) (SCS-alpha)
A0A1X0SBZ8	5980	2	1	Succinic semialdehyde dehydrogenase
A0A1X0RTY9	4349	1	1	Sulphite reductase hemo protein, beta subunit
A0A1X0RKK8	4933	2	1	T-complex protein 1 subunit delta
A0A0A1N750	7172	2	1	Terpene cyclase/mutase family member (EC 5.4.99.-)
A0A1X0RZ60	4653	2	1	TPR-like protein
A0A0C7BF82	5792	2	1	Trehalase (EC 3.2.1.28) (Alpha-trehalose glucohydrolase)
A0A0A1NHG2	6212	2	1	Tryptophan synthase (EC 4.2.1.20)
A0A1X0SCJ6	6498	6	1	t-SNARE
A0A1X0SAG7	4997	10	1	Ubiquitin-related modifier 1
A0A0C7BWQ2	3382	2	1	Uncharacterized protein
A0A0C7AVQ4	3532	1	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NRH4	3545	5	1	Uncharacterized protein
A0A1X0SF93	3547	4	1	Uncharacterized protein
A0A1X0RSA6	3579	8	1	Uncharacterized protein
A0A1X0RLR5	3659	18	1	Uncharacterized protein (Fragment)
A0A0A1MZ78	3659	6	1	Uncharacterized protein
A0A0C7CJ29	3677	5	1	Uncharacterized protein
A0A0C7B3F6	3685	3	1	Uncharacterized protein
A0A1X0RLL1	3716	2	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BRD9	3736	0	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NMC4	3802	11	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BNR3	3895	0	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BMZ9	3898	9	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NEF3	3963	3	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BQE0	4053	2	1	Uncharacterized protein

A0A0C7BWT9	4070	2	1	Uncharacterized protein
A0A0A1MHX1	4108	15	1	Uncharacterized protein
A0A0C7CGU6	4108	7	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BHI4	4282	3	1	Uncharacterized protein
A0A1X0SCV4	4300	5	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BEY1	4320	7	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BF37	4333	3	1	Uncharacterized protein
A0A0A1P552	4340	6	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NBR2	4342	20	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NUV0	4349	1	1	Uncharacterized protein
A0A1X0S0V3	4363	12	1	Uncharacterized protein
A0A1X0S153	4417	4	1	Uncharacterized protein
A0A0C7AX13	4496	6	1	Uncharacterized protein
A0A1X0SC90	4518	0	1	Uncharacterized protein (Fragment)
A0A0C7BRS1	4533	3	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BU75	4564	5	1	Uncharacterized protein
A0A0C7C546	4575	2	1	Uncharacterized protein
A0A0C7C734	4589	5	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NLE4	4639	3	1	Uncharacterized protein
A0A0C7C1J3	4688	0	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BZJ9	4713	5	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NXG5	4803	11	1	Uncharacterized protein
A0A1X0S1X8	4855	4	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BM00	4932	2	1	Uncharacterized protein
A0A0C7B1A2	5039	3	1	Uncharacterized protein
A0A1X0S9I6	5092	3	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BGC0	5106	5	1	Uncharacterized protein
A0A1X0S8A0	5178	1	1	Uncharacterized protein

A0A1X0RWZ1	5245	2	1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A (eIF3a) (Eukaryotic translation initiation factor 3 110 kDa subunit homolog) (eIF3 p110) (Translation initiation factor eIF3, p110 subunit homolog)
A0A0C7BP14	5363	3	1	Uncharacterized protein
A0A0A1N329	5388	3	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BJF3	5393	1	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BE13	5437	4	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BHZ8	5497	3	1	Uncharacterized protein
A0A0C7CEM0	5500	5	1	Uncharacterized protein
A0A0C7C997	5562	4	1	Uncharacterized protein
A0A0C7C7D0	5676	4	1	Uncharacterized protein
A0A0A1P5K9	5699	3	1	Uncharacterized protein
A0A0A1MS40	5713	10	1	Uncharacterized protein
A0A0C7CFE8	5713	25	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BQG4	5787	5	1	Uncharacterized protein
A0A1X0RSE5	5843	6	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BIS4	5843	2	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BW05	5843	12	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NPB0	5843	4	1	Uncharacterized protein
A0A1X0S3E7	5899	1	1	Uncharacterized protein
A0A0A1N704	5908	2	1	Uncharacterized protein
A0A1X0SE80	6076	5	1	Uncharacterized protein
A0A0C7CMM2	6199	7	1	Uncharacterized protein
A0A0A1PBL5	6296	1	1	Uncharacterized protein
A0A0C7C027	6346	4	1	Uncharacterized protein
A0A1X0RSS6	6389	19	1	Uncharacterized protein
A0A0C7AWF1	6498	4	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BSQ1	6669	5	1	Uncharacterized protein
A0A0A1N0R9	6740	2	1	Uncharacterized protein

A0A0C7BI63	6829	6	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BRQ8	6879	2	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BXE9	7010	3	1	Uncharacterized protein
A0A1X0RWK9	7063	9	1	Uncharacterized protein (Fragment)
A0A0C7AXV9	7128	2	1	Uncharacterized protein
A0A1X0S0V1	7167	3	1	Reticulon-like protein
A0A0A1P1J4	7252	14	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BK51	7253	8	1	Uncharacterized protein
A0A0C7B583	7304	1	1	Uncharacterized protein
A0A1X0RXN1	7318	6	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BRF7	7320	3	1	Glucose-6-phosphate 1-epimerase (EC 5.1.3.15)
A0A0A1PES5	7320	4	1	Uncharacterized protein
A0A1X0SC71	7360	2	1	Uncharacterized protein
A0A0C7B202	7360	2	1	Uncharacterized protein
A0A0C7AZQ0	7702	3	1	Uncharacterized protein
A0A0A1PDQ0	7711	4	1	Uncharacterized protein
A0A1X0RLG9	8064	6	1	Uncharacterized protein
A0A0A1PHY7	8087	7	1	Uncharacterized protein
A0A0A1PE71	8120	3	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BEK7	8237	6	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NBP7	8492	9	1	Uncharacterized protein
A0A1X0SCN7	8519	6	1	Uncharacterized protein
A0A0A1P5Q1	8626	4	1	Uncharacterized protein
A0A1X0RVC6	8661	0	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NEX8	8985	5	1	Uncharacterized protein
A0A0C7AYQ1	9069	3	1	Uncharacterized protein
A0A0C7B0B5	9078	3	1	Uncharacterized protein
A0A0C7CN29	9143	5	1	Uncharacterized protein

A0A1X0RKZ0	9209	3	1	Uncharacterized protein
A0A0C7C214	9582	3	1	Uncharacterized protein
A0A0A1NGW1	10206	5	1	Uncharacterized protein
A0A1X0SCV0	10224	11	1	Uncharacterized protein
A0A0C7BBS2	10366	3	1	Uncharacterized protein
A0A1X0RTA8	10887	4	1	Uncharacterized protein
A0A0C7CIU9	11043	5	1	Uncharacterized protein
A0A1X0SCQ2	3789	7	1	Mitochondrial pyruvate carrier